

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR ERFASSUNG PRIMÄRER DNS-LÄSIONEN
DURCH FREMDSTOFFE
MITTELS DER
ISOPYKNISCHEN GLEICHGEWICHTSZENTRIFUGATION
UND DER ALKALISCHEN FILTERRELUTION**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

CORNELIE RISTAU
Bochum 1989

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ERFASSUNG PRIMÄRER DNS-LÄSIONEN
DURCH FREMDSTOFFE MITTELS DER ISOPYKNISCHEN
GLEICHGEWICHTSZENTRIFUGATION UND DER
ALKALISCHEN FILTERRELUTION**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

Cornelie Ristau
Bochum 1989

Referent: Prof. Dr. A. Trebst

Korreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Methylchlorid	2
1.2	1,3-Butadien und Diepoxybutan	5
1.3	Aufgabenstellung	6
2	<u>Material</u>	8
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	8
2.2	Chemikalien	8
2.3	Sonstige Materialien	9
2.4	Geräte	10
2.4.1	Optische Geräte	10
2.4.2	Zentrifugen	11
2.4.3	Waagen	11
2.4.4	Gaschromatographie	11
2.4.5	Sonstige Geräte	12
3	<u>Methoden</u>	13
3.1	Versuche mit Methylchlorid	13
3.1.1	Exposition der Tiere im offenen System	13
3.1.2	Gaschromatographische Analyse	15
3.1.3	Präparative Methoden	15
3.1.3.1	Präparation der Zellkerne	15
3.1.3.2	Lyse von Zellkernen und Nukleoproteindissoziation	16
3.1.3.3	Inkubation von Zellkernen mit Formaldehyd	16
3.1.3.4	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation mit Caesiumtrifluoracetat (CsTFA)	17
3.1.3.4.1	Prinzip der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation	17

3.1.3.4.2	Herstellen der Anfangsdichte des Gradientenmediums	18
3.1.3.4.3	Probenaufbereitung und isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen	18
3.1.4	Analytische Methoden	19
3.1.4.1	Konzentrationsbestimmung von DNS	19
3.1.4.2	Konzentrationsbestimmung von Protein	19
3.1.5	Alkalische Filterelution	20
3.1.5.1	Versuchsdurchführung	20
3.2	Versuche mit Diepoxybutan und Buta- dien	23
3.2.1	Exposition der Tiere im offenen System gegen Butadien	23
3.2.2	Präparative Methoden	23
3.2.3	Präparation von Zellkernen	23
3.2.2.3	Inkubation von Zellkernen mit Diepoxybutan	23
3.2.2.3	Isolierung und Reinigung von Nuklein- säuren	23
3.2.2.3.1	Phenolextraktion der Leberproben	23
3.2.2.3.2	Hydroxylapatit-Chromatographie	24
3.2.2.3.3	Ultrafiltration der Nukleinsäure- proben	25
3.2.2.4	Inkubation von gereinigter DNS mit Diepoxybutan	25
3.2.2.5	Probenaufbereitung und CsTFA-Dichte- gradientenzentrifugation	25
3.2.3	Alkalische Filterelution	26
3.2.4	T_m -Wert ("temperature of melting")	26
4	<u>Ergebnisse</u>	28
4.1	Versuche mit Methylchlorid	28
4.2.1	Trennung von DNS und Protein mit Hilfe der isopyknischen Gleichge- wichtszentrifugation	29

4.2.2	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen	31
4.2.3	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Formaldehyd behandelten Zellkernen	32
4.2.4	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von lysierten Zellkernen aus Nieren von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen (B6C3F1)	36
4.3	Alkalische Filterelution	38
4.3.1	Alkalische Filterelution von DNS aus Lebern und Nieren von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten Mäusen (B6C3F1)	39
4.3.2	Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar bzw. 5 h oder 48 h nach der Exposition	42
4.3.3	Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar bzw. 5 h nach der Exposition	47
4.4	Versuche mit Diepoxybutan	50
4.4.1	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Diepoxybutan behandelte DNS	50
4.4.2	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Diepoxybutan behandelten Zellkernen	53
4.4.3	Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von DNS aus Lebern von gegenüber Butadien (2000 ppm, 8 h/Tag, 7 Tage) exponierten Mäusen (B6C3F1) und Ratten (Sprague Dawley)	56
4.5.1	Alkalische Filterelution von DNS aus mit Diepoxybutan behandelten Leberzellkernen von Mäusen (B6C3F1)	58
4.5	Schmelzkurvenverhalten von mit Diepoxybutan modifizierter DNS	63

5	<u>Diskussion</u>	65
5.1	Methylchlorid	65
5.1.1	Übertragbarkeit der karzinogenen Wirkung von Methylchlorid auf den Menschen	72
5.2	1,3-Butadien und Diepoxybutan	73
6	<u>Zusammenfassung</u>	77
7	<u>Anhang</u>	79
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	88
9	<u>Abkürzungen</u>	102

Einleitung

Zahlreiche chemische Agentien sind in der Lage, im Tierversuch Krebs zu erzeugen. Grundsätzlich kann damit gerechnet werden, daß sie auch den Menschen gefährden, wenn auch das Ausmaß der Gefährdung durch Art und Dauer der Exposition, Dosis, hormonelle Einflüsse und Unterschiede im Stoffwechsel stark modifiziert sein kann. Die Erfassung solcher Stoffe (Karzinogene) ist daher von großer praktischer Bedeutung, um ihre eventuelle Anwendung für bestimmte Zwecke (z.B. Lebensmittelfarbstoffe, Pflanzenschutz- und Arzneimittel, Industriechemikalien) zu regulieren.

Die überwiegende Mehrzahl der bisher in Tierversuchen erkannten Karzinogene erweist sich in geeigneten Testsystemen als mutagen (DNS-schädigend). Karzinogene mit solchen genotoxischen Wirkungen sind entweder selbst reaktionsfähig, oder sie werden im Stoffwechsel in aktive Folgemetaboliten umgewandelt, die ihrerseits mit DNS reagieren.

Zur Erfassung primärer DNS-Läsionen können u.a. Methoden angewandt werden, bei denen Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften von DNS als Indikatoren für genotoxische Wirkungen von Chemikalien dienen. So lassen sich beispielsweise DNS-Einzelstrangbrüche, DNS-Protein-Quervernetzungen und DNS-DNS-Quervernetzungen mit der sehr empfindlichen "alkalischen Filterelution" identifizieren, deren Methodik auf dem unterschiedlichen Elutionsverhalten von Kontroll- und modifizierter DNS von Polycarbonatfiltern unter denaturierenden alkalischen Bedingungen beruht.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, mit Hilfe physikochemischer Methoden DNS-Läsionen zu erfassen, die in vivo oder in vitro unter Einwirkung einiger ausgewählter Karzinogene verursacht werden können. Bei den zu prüfenden Chemikalien handelte es sich um den monohalogenierten Kohlenwasserstoff Methylchlorid und das bifunktionell alkylierende Diepoxybutan, einem Zwischenprodukt der tumorauslösenden Verbindung 1,3-Butadien.

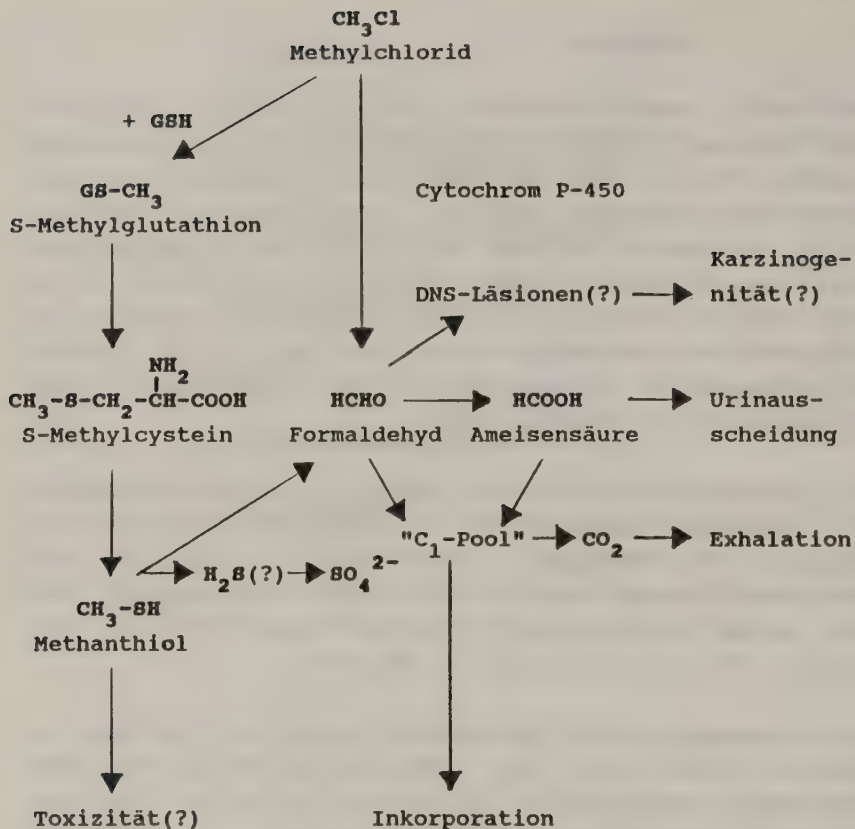


Abb. 1: Metabolismus von Methylchlorid in Anlehnung an Djalali-Behzad et al. (1981), Sklan und Barnsley (1968), Johnson (1966), Kornbrust und Bus (1983)

1.1 Methylchlorid

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes (1986) ist in der Bundesrepublik Deutschland von Anfang bis Mitte der achtziger Jahre die Produktion des monohalogenierten Kohlenwasserstoffes Methylchlorid von 98.000 t (1982) auf 136.000 t (1985) gestiegen. Mehr als 90 % des hergestellten Methylchlorids wird in der Industrie als Methylierungsmittel für chemische Synthesen verwendet. Methylchlorid wurde von

der MAK("Maximale Arbeitsplatzkonzentration")-Kommission der DFG ("Deutsche Forschungsgemeinschaft") der Gruppe III B der MAK-Werteliste als "Stoff mit begründetem Verdacht auf krebs-erzeugendes Potential" zugeordnet (Henschler, 1984).

Erste Hinweise auf mögliche krebserzeugende Wirkungen von Methylchlorid erbrachte eine zweijährige Inhalations-Karzinogenitätsstudie mit Methylchlorid an B6C3F1-Mäusen beiderlei Geschlechts (Batelle Columbus Laboratories, 1981). Bei männlichen Tieren traten bei einer Expositionskonzentration von 1000 ppm Methylchlorid (6 h/Tag, 5 Tage) signifikant vermehrt Nierentumoren auf, während bei weiblichen Mäusen keine Tumoren beobachtet wurden.

Methylchlorid wird größtenteils zu Ameisensäure und CO_2 metabolisiert (Kornbrust und Bus, 1982), wobei ein Teil über den C_1 -Pool (Tetrahydrofolsäure) in den Intermediärstoffwechsel eingeht und in DNS und Protein eingebaut wird (Kornbrust und Bus, 1982; Peter et al., 1985). Hierbei wird davon ausgegangen, daß Formaldehyd intrazellulär als Zwischenprodukt auftritt (Bus, 1982). Es ergab sich die Frage, ob möglicherweise die Entstehung von Nierentumoren durch Methylchlorid in männlichen Tieren auf eine Akkumulation von Formaldehyd zurückgeführt werden kann. Höhere Konzentrationen an Formaldehyd erweisen sich in geeigneten Systemen lokal als krebserzeugend und verursachen DNS-Protein-Quervernetzungen (Grafstrom et al., 1983). Die Theorie der Wirkung endogen gebildeten Formaldehyds unter Methylchloridbelastung wurde von der MAK-Kommission mit dazu herangezogen, Methylchlorid in die Gruppe III B der MAK-Werte-Liste einzugruppieren.

Wie in Abb. 1 gezeigt wird, kommen zwei Reaktionswege für die Bildung von Formaldehyd in Betracht.

Es besteht ein primärer Metabolismusschritt in der enzymatischen Konjugation von Methylchlorid mit Glutathion. Hierbei wird über Glutathion-S-Transferase(n) S-Methylglutathion gebildet (Dodd et al., 1982; Landry et al., 1983). Damit ist eine starke Glutathiondepletion nach der Exposition von Versuchstieren gegenüber Methylchlorid in verschiedenen Geweben

(Leber, Niere, Gehirn) erklärbar (Kornbrust und Bus, 1983; Jäger et al., 1988). Methylglutathion wird durch die Aktivität der Glutamyltranspeptidase und einer unspezifischen Di-peptidase zu S-Methylcystein umgesetzt (Kornbrust und Bus, 1983). S-Methylcystein kann weiter zu Methanthiol und dieses zu Formaldehyd abgebaut werden (Mazel et al., 1964).

Eine Beteiligung von Cytochrom P-450 im Sinne einer direkten Umsetzung von Methylchlorid zu Formaldehyd ist ebenfalls möglich. Dieser Metabolismus findet durch Beobachtungen von Jäger et al. (1988) Unterstützung, in denen der Nachweis von Formaldehyd nach Inkubationen von Methylchlorid und Lebermikrosomen (aus Mäusen beiderlei Geschlechts) und Nierenmikrosomen (männlicher Mäuse) erbracht wurde. Von Jäger et al. (1988) wurde jedoch dieser Umsetzung von Methylchlorid zu Formaldehyd durch Cytochrom P-450 nur eine Bedeutung als Nebenweg des Stoffwechsels beigemessen. Für diese Aussage sprach die relativ niedrige Metabolierungsrate der Mikrosomen. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, daß sich nach einem Absinken des Glutathion-Spiegels der Metabolismus des inkorporierten Methylchlorids von der ursprünglich dominierenden Konjugation an Glutathion zugunsten einer oxidativen Dehalogenierung zu Formaldehyd an Cytochrom P-450 verschiebt.

erscheint eine Gefährdung des Menschen durch diese Chemikalie als möglich. 1,3-Butadien wurde 1984 von der MAK-Kommission der Gruppe A 2 des Abschnittes III (krebserzeugende Arbeitsstoffe) zugeordnet (Henschler, 1984).

Als ein gentoxisches Folgeprodukt von 1,3-Butadien kommt das sehr reaktive Diepoxybutan in Betracht. Durch Inkubationen in vitro von Butadien mit Rattenlebermikrosomen konnten Malvoisin und Roberfroid (1982) zeigen, daß Diepoxybutan neben dem 1,2-Epoxybuten-3 durch mikrosomale Enzyme aus 1,3-Butadien entsteht. Vermutlich ist die alkylierende Potenz dieser Zwischenprodukte für die mutagene bzw. karzinogene Wirkung von Butadien verantwortlich. So konnten von Kreiling (1987) und Jelitto (1988) in DNS-Hydrolysaten aus Lebern von gegenüber Butadien exponierten Mäusen (B6C3F1) Alkylierungsreaktionen an DNS (N-7-Guaninaddukte) nachgewiesen werden.

Zusätzliche Hinweise, daß Diepoxybutan intermediär aus Butadien gebildet werden kann, ergaben sich aus Untersuchungen von Vangala et al. (1987, 1989), die mit Hilfe der alkalischen Elution Anzeichen von DNS-DNS-Quervernetzungen (neben DNS-Protein-Quervernetzungen und Einzelstrangbrüchen) nach Exposition von B6C3F1-Mäusen gegenüber Butadien ab einer äußeren Luftkonzentration von 500 ppm in den Lebern der Tiere feststellten. Die Vernetzung der beiden DNS-Stränge kommt wahrscheinlich durch eine bifunktionelle Alkylierung des Diepoxybutans an der N-7 Position von Guanin in "GpC" Sequenzen des DNS-Moleküls zustande (Lawley und Brookes, 1967).

1.3 Aufgabenstellung

Die vorliegenden Untersuchungen dienten der Erfassung von DNS-Läsionen, die unter Einwirkung verschiedener Fremdstoffe in vivo und in vitro entstehen können. Bei den zu untersuchenden Chemikalien handelte es sich um Methylchlorid und Diepoxybutan.

Eine Inhalations-Karzinogenitätsstudie mit Methylchlorid an Mäusen (B6C3F1) hat die Frage einer selektiven Tumorbildung durch diese Substanz in den Nieren männlicher Mäuse aufgeworfen. Als kritischer Metabolit von Methylchlorid wurde Formaldehyd mit der Entstehung von Nierentumoren in Zusammenhang gebracht. Da jedoch der direkte Nachweis von intermediär gebildetem Formaldehyd im Gewebe schwierig ist, konnte die Frage, ob es unter einer hohen Methylchloridbelastung (ab 1000 ppm) zu einer Akkumulation von Formaldehyd in Nieren und letztlich zu den für Formaldehyd charakteristischen DNS-Läsionen kommt, durch Metabolismusstudien von Jäger et al. (1988) nicht endgültig geklärt werden. Im ersten Teil der Arbeit sollten daher die vorliegenden Untersuchungen Aufschluß über das Auftreten von für Formaldehyd charakteristischen DNS-Protein-Quervernetzungen in Lebern beziehungsweise Nieren nach der Exposition von Mäusen (B6C3F1) gegenüber Methylchlorid geben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit Diepoxybutan behandelte DNS (oder Zellkerne) sowie DNS aus Lebern von gegenüber Butadien exponierten Mäusen (und Ratten) auf Primärläsionen hin untersucht. Diepoxybutan kommt als ein eventuelles reaktives Zwischenprodukt von Butadien in Betracht. Ziel war letztlich, die gentoxischen Effekte von Diepoxybutan und von Butadien miteinander zu vergleichen.

Für den Nachweis primärer DNS-Schäden wurde die alkalische Filterelution angewendet. Die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation kam als eine mögliche Alternative für die Erfassung von DNS-Protein- und DNS-DNS-Quervernetzungen ebenfalls zum Einsatz. Als Gradientenmedium wurde Caesiumtrifluoracetat (CsTFA) verwendet, das laut Literatur (Carter et al., 1983) im Vergleich zu anderen Caesiumsalzen mehrere Vorteile aufweist (siehe 3.1.3.4.1). Die beiden Methoden sollten bezüglich ihrer Empfindlichkeit miteinander verglichen werden.

2 Material

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Männliche und weibliche Mäuse (Stamm: B6C3F1) sowie männliche Ratten (Stamm: Sprague Dawley) wurden von dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) bezogen. Das durchschnittliche Tiergewicht bei der Durchführung der Versuche betrug 25-30 g bei Mäusen und 200-250 g bei Ratten.

Die Versuchstiere waren zu Beginn der jeweiligen Untersuchungen etwa 12 Wochen alt. Sie konnten sich nach dem Eintreffen im Institut mindestens eine Woche an die neuen Stall- und Ernährungsbedingungen gewöhnen, ehe sie für Untersuchungen verwendet wurden.

Die männlichen Mäuse wurden in Einzelkäfigen gehalten, um Verletzungen durch Dominanzkämpfe zu vermeiden. Bei weiblichen Mäusen und bei Ratten erfolgte eine Gruppentierhaltung mit jeweils 6 Tieren.

Die Versuchstiere waren in klimatisierten Tierhausräumen bei einer Temperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von durchschnittlich 60% untergebracht. Trockenfutter (Altromin^R 1324, Altrogge GmbH, Lage/Lippe) sowie Trinkwasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.2 Chemikalien

Alle von den genannten Firmen bezogenen Chemikalien und Biochemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

ALDRICH Chemical Co., Milwaukee, USA: Diepoxymethan

BOEHRINGER GmbH, Mannheim: Proteinase K aus Tritirachium album (EC 3.4.21.14); Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas (EC 3.1.4.5)

CALBIOCHEM GmbH, Frankfurt: Fluorochromfarbstoff Bisbenzamidin H 33258; Hydroxylapatit "High Resolution"

FLUKA, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm: Tetraethylammoniumhydroxid, 20 %ige Lösung

E. MERCK, Darmstadt: Aceton; Calciumchlorid; Diethylether; Essigsäure (99,5-100 %); Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Formaldehyd (min. 37 %); Harnstoff; Isoamylalkohol; Kaliumchlorid; Kaliumdihydrogenphosphat; di-Kaliumhydrogenphosphat; Kaliumhydroxid; Kupfersulfat; Magnesiumchlorid; Natriumchlorid; Natriumdihydrogenphosphat; di-Natriumhydrogenphosphat; Natriumhydroxid; Natriumlauroylsarkosinat; Natriumdodecylsulfat; Phenol; Saccharose; Salzsäure, rauchend (37 %); Titriplex^R II (Ethylendinitrolotetraessigsäure); Titriplex^R III (Ethylendinitrolotetratetraessigsäure, Dinatriumsalz); Triton^R X-100.

MESSER-GRIESHEIM Industriegase, Düsseldorf: 1,3 Butadien, Methylchlorid, Sauerstoff für medizinische Zwecke, Stickstoff; Stickstoff flüssig; synthetische Luft; Wasserstoff

PHARMACIA, Uppsala, Schweden: Caesiumtrifluoracetat (CsTFATM)

RIEDEL DE HAEN AG, Seelze-Hannover: Chloroform, Ethanol

SERVA-Feinbiochemika GmbH, Heidelberg: Trypanblau, 0,5 %ig in phys. Kochsalzlösung

SIGMA-Chemie GmbH, Taufkirchen: Rinderserumalbumin (98-99 %), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

2.3 Sonstige Materialien

AMICON GmbH, Witten: Diaflo-Ultrafiltrationsmembranen YM 10.

BRANDT KG, Wertheim: Pasteur-Pipetten, 180 mm

BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen: Kanülen, Spritzen

BOHLENDER, Lauda-Tauber: Plexiglasbehälter (Vol. 50 l), gasdicht

EPENDORF-GERÄTEBAU GmbH, Hamburg: Reaktionsgefäße

HENKE-SASS WOLF GmbH, Tuttlingen: Einmalspritzen

ISMATEC GmbH, Wertheim-Mondfeld: Vinylschläuche, 0,38 mm ID

LINDE AG, Essen: Plastigas^R-Beutel mit Schraubventil, 10 l

MILLIPORE GmbH, Neu-Isenburg: Millipore Filter, HV 0,45 µm

NUCLEOPORE GmbH, Tübingen: Nucleopore Polycarbonat-Filter SN 110611, Durchmesser: 25 mm

REICHELTE Chemietechnik GmbH + Co., Heidelberg: Nylongewebe Thomapore, 30 µm

2.4 Geräte

2.4.1 Optische Geräte

BODENSEEWERK PERKIN ELMER & Co. GmbH, Überlingen: Lambda 5 UV/VIS Spektralphotometer

ISCO, Lincoln, Neb., USA: Absorptionsmonitor UA5 mit Multiplexer Expander 1132 und optischer Einheit (Typ 6)

KNAUER AG, Berlin: UV/VIS Filter-Photometer (Typ 97.00)

SHIMADSU, GmbH, Düsseldorf: Fluoreszenz Spektrometer R5-530

2.4.2 Zentrifugen

BECKMAN INSTRUMENTS GmbH, Düsseldorf: Kühlzentrifuge J2-21 mit Festwinkelrotor JA 20

EPPENDORF GERÄTEBAU GmbH, Hamburg: Tischzentrifuge 5414 S

HEREAUS-CHRIST GmbH, Osterode/Harz: Kühlzentrifuge Minifuge 1 mit Tragringrotor 3350; Labofuge 1 mit Festwinkelrotor 2070 und Ausschwingrotor 2106

KONTRON-TECHNIK GmbH, Eching: Ultrazentrifuge TGA-50 mit Festwinkelrotor TFT 65.13

2.4.3 Waagen

METTLER-WAAGEN GmbH, Gießen: Analysenwaage AE 160

SARTORIUS GmbH, Göttingen: Präzisionswaage 3707-MPI

2.4.4 Gaschromatographie

BODENSEEWERK PERKIN-ELMER & Co. GmbH, Überlingen: Gaschromatograph Sigma 4

HEWLETT-PACKARD GmbH, Böblingen: Gaschromatograph 5890 A (Kapillarsäule); Integrator 3390

ICT-Handelsgesellschaft GmbH, Frankfurt: Kapillarsäule DB-5, J&W Scientific, Fused Silica, 30 m x 0,25 mm ID, Belegung: kreuzweise vernetztes und chemisch gebundenes (95 %) - Dimethyl-(5%)-diphenylpolysiloxan, Filmdicke 0,25 µm

VARIAN GmbH, Darmstadt: Gaschromatograph Series 1400

SHIMADSU GmbH, Düsseldorf: Gaschromatograph GC-8A mit Integrator C-R3A

2.4.5 Sonstige Geräte

ABIMED GmbH, Düsseldorf: Schlauchpumpe Minipuls 2

AMICON GmbH, Witten: Ultrafiltrationszellen RC 800, 8010 und 8050

BANDELIN ELEKTRONIK LAB., Berlin: Ultraschallbad Sonorex RK 102 H

B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen: Homogenisator Potter S

HEIDOLPH-ELEKTRO GmbH, Göttingen: Magnetrührwerke MR 2002

HEINEMANN GmbH, Schwäbisch-Gmünd: Rollenmischer Assistent RM 5

HEREAUS-CHRIST GmbH, Osterode: Gefriertrocknungsanlage Beta 1

JANKE & KUNKEL KG., Staufen: Homogenisator Ultra-Turrax 18-10

KAESER, Coburg: Kompressor KCT 1, ölfrei

LINSEIS GmbH, Selb: Einkanalschreiber L 6510

MILTON ROY GmbH, Hasselroth: Integrator CI-10; Schreiber SEK

MÜLLER, Dortmund: Röntgenstrahlenquelle RT 250

SCHOTT GERÄTE GmbH, Hofheim: pH-Meter CG 820

3 Methoden

3.1 Versuche mit Methylchlorid

3.1.1 Exposition der Tiere im offenen System

Die Versuchstiere (in der Regel sechs B6C3F1 Mäuse pro Versuch) wurden in einem gasdichten Plexiglasbehälter (Bohlender, Vol. 50 l), der durch eine Frontklappe geöffnet werden konnte, gegen 1000 ppm Methylchlorid exponiert (Abb. 1). Der Luftstrom (4 l/min) in den Behälter wurde mit Hilfe eines ölfreien Kompressors erzeugt. Die Testsubstanz wurde aus einem Gasbeutel (Linde) in das System gepumpt und vor Eintritt in den Behälter mit der Luft in einer gläsernen Düse vermischt. Die Dauer der Exposition betrug 8 h/Tag (bei einem viertägigen Expositionsversuch 6 h/Tag). Der Behälter wurde unmittelbar nach Beendigung der Exposition bei geschlossenem Abzug belüftet; die Tiere herausgenommen, getötet, und Leber sowie Nieren entnommen.

Die Expositionsversuche wurden mehrfach unter gleichen Bedingungen wiederholt; die Versuchstiere wurden für je ein Experiment verwendet.

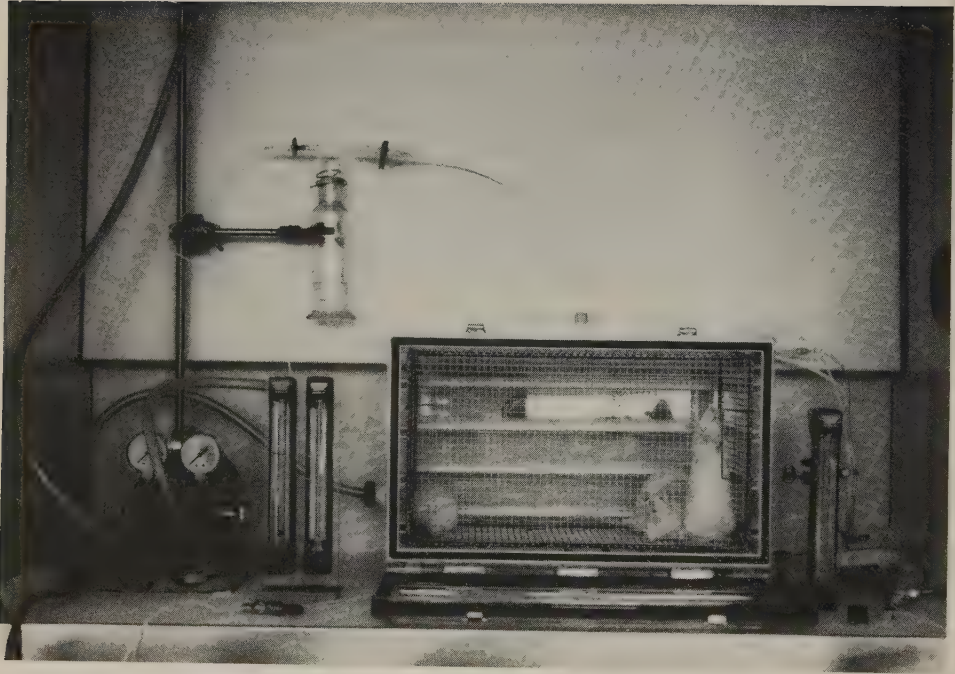


Abb. 3: Experimenteller Aufbau zur Exposition von Versuchstieren gegenüber Methylchlorid

3.1.2 Gaschromatographische Analyse

Die Konzentration des Gases wurde während der Exposition gaschromatographisch kontrolliert, indem in regelmäßigen Abständen aus dem Glasbehälter Gasproben entnommen und über eine Gasdosierschleife auf einer 1/4 Zoll GC-Glassäule (4 m lang, gefüllt mit Tenax GC^R, 35-GC mesh) analysiert wurden. Die Analysebedingungen waren: Trägergasstrom (N₂): 60 l, synthetische Luft: 300 ml und H₂: 30 ml für den Flammenionisationsdetektor, Ofentemperatur: 100°C.

Bei allen Experimenten erfolgten Kontrollmessungen definierter Mengen von Methylchlorid. Die Testsubstanz wurde in einem Gasgefäß mit einem Volumen von 6,38 l auf eine bestimmte Konzentration eingestellt und gaschromatographisch analysiert.

3.1.3 Präparative Methoden

3.1.3.1 Präparation der Zellkerne

Die Aufbereitung von Zellkernen erfolgte nach einer von Rickwood und Birnie (1976) beschriebenen Methode.

Zur Gewinnung der Zellkerne wurden unmittelbar (oder 5 h bzw. 48 h) nach der Exposition die Versuchstiere (und eine gleiche Anzahl an unbehandelten Kontroll-Tieren) durch Genickschlag getötet, entblutet und Leber und Nieren entnommen. Das Gewebe wurde in 3 Volumen eisgekühltem "Puffer A" (0,25 M Saccharose, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) suspendiert. Die Organe wurden mit einer Schere oder einem Skalpel zerkleinert und in "Puffer A" unter Eiskühlung homogenisiert und bei 1000 g 10 min lang zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge Modell J2-21). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in "Puffer A" aufgenommen und erneut bei 1000 g für 10 min sedimentiert. Der Niederschlag wurde in "Puffer B" (2,2 M Saccharose, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) suspendiert und bei 40.000 g 1 h lang in einer Kontron TGA-50 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der braune Überstand (Verunreinigungen) wurde verworfen und der weiße Niederschlag (Zellkerne) abermals in "Puffer A" homogenisiert und bei 1000 g für 10 min sedimentiert. Das

Pellet wurde in "Puffer C" ("Puffer A" + 1% Triton X-100) homogenisiert und ebenfalls 10 min lang bei 1000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit "Puffer A" gewaschen und die so gewonnenen Zellkerne unmittelbar nach der Aufarbeitung für weitere Versuche verwendet.

3.1.3.2 Lyse von Zellkernen und Nukleoproteindissoziation

Die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe kann gleichzeitig mit dem Aufschluß der Zellkerne in einem Arbeitsgang erfolgen. Die Zellkerne wurden in "Puffer D" (0,1 mM EDTA, 0,1 M KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) mit Natriumlauroylsarkosinat (4%) lysiert. Gleichzeitig dissoziieren durch dieses Reagenz Nukleoproteinkomplexe. Natriumlauroylsarkosinat wurde anstelle von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund einer besseren Löslichkeit in Caesiumsalzgradienten verwendet. Proteinase K (50 µg/ml) wurde nach der Lyse je nach Bedarf eingesetzt (1 Stunde). Die Zellkerne wurden anschließend einer isopyknischen Caesiumtrifluoracetat-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen.

3.1.3.3 Inkubation von Zellkernen mit Formaldehyd

Als eventuelles Folgeprodukt von Methylchlorid kommt Formaldehyd in Betracht. Formaldehyd verursacht in höheren Konzentrationen DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellen (Kohn, 1983). Nach einer Reaktion mit Formaldehyd können die an die DNS kovalent gebundenen Proteine durch ionische Reagenzien (wie z.B. Natriumlauroylsarkosinat oder das als Gradientenmedium verwendete Caesiumtrifluoracetat) nicht mehr abdissoziiert werden. Mit dem Ziel, durch Formaldehyd entstandene DNS-Protein-Quervernetzungen quantitativ zu erfassen, wurden Zellkerne aus Nieren von nicht-exponierten Mäusen mit Formaldehyd in einem Konzentrationsbereich von 0,01 % - 2 % in "Puffer A" (siehe 3.1.3.1) 4 h lang inkubiert. Die Zellkerne wurden nach der Behandlung mit Formaldehyd sedimentiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5414 S) und der Überstand verworfen. Die Zellkerne wurden in "Puffer D" (siehe 3.1.3.2) auf-

genommen, mit Natriumlauroylsarkosinat (4%) lysiert (wie 3.1.3.2) und anschließend einer isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation mit Caesiumtrifluoracetat (CsTFA) unterzogen.

3.1.3.4 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation mit Caesiumtrifluoracetat (CsTFA)

3.1.3.4.1 Prinzip der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation

Für eine isopyknische Gleichgewichtszentrifugation sind eine hohe Rotorgeschwindigkeit und eine ausreichend lange Zentrifugationszeit erforderlich. Während der Zentrifugation kommt es zur selbstformenden Ausbildung eines Dichtegradienten. Im Schwerfeld einer Zentrifuge sedimentierende Partikel wandern solange durch den Dichtegradienten, bis die Dichte der Umgebung mit ihrer eigenen übereinstimmt. Die nach Einstellung des Gleichgewichtes fortgesetzte Zentrifugation beeinflusst die einmal erfolgte Partikeltrennung nicht. Der grundlegende Unterschied zur Zonenzentrifugation besteht darin, daß bei der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation die Trennung ausschließlich auf der unterschiedlichen Dichte von Teilchen beruht und nicht auf der Partikelgröße. Im Gleichgewicht sind die Partikel in Form einer Bande angereichert, deren Breite von dem Wechsel zwischen Sedimentation, Flotation und Diffusion bestimmt wird.

Als Gradientenmedium wurde Caesiumtrifluoracetat (CsTFA) als geeignet erachtet. CsTFA weist im Vergleich zu anderen Caesiumsalzen mehrere Vorteile auf. Mit CsTFA lassen sich ausreichend hohe Dichten erreichen, um die Trennung aller Arten von Nukleinsäuren zu ermöglichen. Nukleasen werden inhibiert und Proteine im allgemeinen vollkommen von den Nukleinsäuren getrennt. Nukleinsäuren lassen sich direkt aus einem CsTFA-Gradientenmedium z.B. mit Ethanol fällen.

3.1.3.4.2 Herstellen der Anfangsdichte des Gradientenmediums

Die folgende Formel wurde angewandt, um die CsTFA-Lösung auf die gewünschte Dichte einzustellen. Als verdünnendes Medium wurde "Puffer D" verwendet.

$$V_x = V_o (p_o - p) / (p - p_x)$$

V_x = Volumen des verdünnenden Mediums (ml)

V_o = Volumen der ursprünglichen CsTFA-Lösung (ml)

p_o = Dichte der ursprünglichen CsTFA-Lösung (g/ml)

p_x = Dichte des verdünnenden Mediums (g/ml)

p = gewünschte Dichte der CsTFA/"Puffer D" Lösung

Die Dichte des Gradientenmediums wurde auf 1,6 g/ml eingestellt.

3.1.3.4.3 Probenaufbereitung und isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen

Lysierte Nierenzellkerne von unbehandelten und gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten Mäusen (Stamm: B6C3F1) mit einer Extinktion (260 nm) von 1,3-1,8/0,5 ml Lösung (1 cm Schichtlänge) wurden dem CsTFA enthaltenden "Puffer D" hinzugefügt und die Anfangsdichte des Mediums auf 1,6 g/ml eingestellt. Nach der Ultrazentrifugation (227.000 x g, 48 h, 18°C) wurde der Gradient von unten nach oben fraktioniert (21 Fraktionen), indem die Röhrchen unten angestochen und in Fraktionen entleert wurden. Die Extinktion der Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen. Die Fraktionen wurden jeweils mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt, gegen aqua bidest. dialysiert und dann gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Proben wurden in "Puffer D" in einem dem der

Fraktionen entsprechenden Volumen wieder aufgenommen; die Extinktionen wurden bei 260 nm sowie 280 nm gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951).

3.1.4 Analytische Methoden

3.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNS

Zur Konzentrationsbestimmung von DNS wurde die Extinktion der Proben bei 260 nm gemessen; der Gehalt an DNS wurde anhand von mit DNS aus Kalbsthymus aufgenommenen Eichgeraden ermittelt.

Zur Ermittlung geringer Mengen an DNS wurde die DNS fluorometrisch bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine DNS-Stammlösung von 1,0 mg/ml angesetzt. Davon wurden Mengen im Bereich von 0-10 µg entnommen und nach Zugabe von jeweils 2,0 ml SSC Puffer (0,154 M NaOH, 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,0) sowie 1,0 ml Bisbenzamid H 33258-Farbstoff ($1,5 \times 10^{-6}$ M) fluorometrisch (365 nm Anregung; 450 nm Emission) gemessen. Die Konzentration an DNS in der zu messenden Probe wurde anhand der Eichgeraden ermittelt.

3.1.4.2 Konzentrationsbestimmung von Protein

Proteinbestimmungen wurden in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Die nach der Fällung mit Ethanol gewonnenen, gefriergetrockneten und in "Puffer D" aufgenommenen Proben (3.1.3.4.3) wurden hierfür eingesetzt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (1 mg/ml), welches für eine Eichreihe in einem Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml verdünnt wurde. 200 µl des Standards bzw. der zu messenden Probe wurden mit aqua bidest. auf 500 µl aufgefüllt. 2 ml eines alkalischen Kupferreagenzes (bestehend aus 0,6 ml 2,7 %iger Na^+/K^+ -Tartrat-Lösung, 0,6 ml 1 %iger $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung und 60 ml 2%iger Na_2CO_3 -Lösung in 1 M NaOH) wurden hinzugefügt und die Proben 10 Minuten stehengelassen. Anschließend wurden 250 µl Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Merck) zugegeben, das vorher 1:1,36 mit aqua bidest. ver-

dünnt worden war. Nach 40 Minuten wurde die Extinktion der Proben bei 750 nm gegen einen mitgeführten Blindwert gemessen.

3.1.5 Alkalische Filterelution

Die alkalische Filterelution wurde zur Erfassung primärer DNS-Schäden von Kohn et al. (1981) entwickelt und von Sterzel et al. (1985) im Hinblick auf die DNS Analyse modifiziert. Diese Technik ermöglicht den Nachweis von Einzelstrangbrüchen sowie von DNS-DNS- und DNS-Protein-Quervernetzungen.

Die Methodik der alkalischen Filterelution beruht auf dem unterschiedlichen Elutionsverhalten von Kontroll- und modifizierter DNS unter denaturierenden alkalischen Bedingungen (pH über 12) nach Auftragung von lysierten Zellen oder Zellkernen auf Membranfilter. Eine erhöhte Elutionsgeschwindigkeit der DNS von mit der zu prüfenden Chemikalie behandelten Tieren im Vergleich mit DNS von unbehandelten Tieren weist auf Einzelstrangbrüche hin, während eine verzögerte Elutionsgeschwindigkeit auf mögliche DNS-DNS oder DNS-Protein-Quervernetzungen schließen läßt. Mit Hilfe einer Proteinase K-Behandlung nach Bestrahlung (600 rad) der Zellkerne, welche eine statistische Verteilung von Einzelstrangbrüchen ergibt, lassen sich DNS-DNS - und DNS-Protein-Quervernetzungen voneinander unterscheiden.

3.1.5.1 Versuchsdurchführung

Nieren oder Leber aus je sechs unbehandelten oder je sechs gegenüber Methylchlorid (1000 ppm) exponierten B6C3F1 Mäusen wurden in eisgekühltem "Puffer I" ("PBS"-Puffer, pH 7,4: NaCl, 0,14 M; KH_2PO_4 , 1,47 mM; KCl, 2,7 mM; Na_2HPO_4 , 8,1 mM; Na_2EDTA , 10 mM) in kleine Stücke geschnitten, homogenisiert und durch Nylongewebe (Porengröße 30 μm) filtriert. 200 μl der filtrierten Suspension und 100 μl Trypanblau (0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung) wurden vermischt und die Zellkernzahl mit Hilfe eines Mikroskops in einer Neubauer-

Zählkammer bestimmt. Die Suspensionen wurden auf $1,5 \times 10^{-6}$ Zellkerne/ml mit "Puffer I" verdünnt; ein Teil davon wurde jeweils mittels einer Röntgen-Strahlenquelle (RT 250 der Städtischen Kliniken Dortmund) mit 600 rad bestrahlt. Von den bestrahlten und unbestrahlten Proben exponierter und unbehandelter Tiere wurde jeweils 1 ml auf sechs "Nukleopore N 110611" Polycarbonat-Filter (Porengröße $2 \mu\text{m}$) pipettiert (insgesamt 24 Filter), die in Filterhaltern "Swinnex SX 00025" eingespannt waren. Die Zellkerne wurden mit maximaler Pumpengeschwindigkeit auf die Filter sedimentiert und zweimal mit 3 ml "Puffer I" und einmal mit 5 ml "Puffer I" gewaschen. Unter diesen nicht-denaturierenden Bedingungen blieben die Zellkerne auf den Filtern liegen. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch Zugabe von 3 ml Puffer "II" (2% SDS, 0,02 M Na_2EDTA , 0,1 M Glycin, pH 10,0), wobei ein Teil des Puffers zusätzlich mit Proteinase K (0,5 mg/ml) versetzt worden war und den entsprechenden Proben zugegeben wurde. Nach 1 h wurde "Puffer II" abgesaugt und die auf dem Filter liegengebliebene DNS zweimal mit 5 ml Puffer "III" (0,02 M Na_2EDTA , pH 10,0) gewaschen. Durch das Waschen wurden von der DNS andere Zellkernbestandteile abgetrennt. Die DNS wurde innerhalb einer Laufzeit von 10-12 h mit 20 ml "Puffer IV" (88 mM Tetraethylammoniumhydroxid, 0,02 M EDTA-Säure, pH 12,1) eluiert, wobei die Pumpe auf 0,033 ml/min eingestellt worden war. Nach Beendigung der alkalischen Elution wurde in den Fraktionen der Gehalt an DNS mit $1,5 \times 10^{-6}$ M Fluorchromfarbstoff (Calbiochem, Bisbenzamid H 33258) bestimmt, der in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer gelöst war. Die in den Fraktionen eluierte DNS wurde jeweils von der ursprünglichen Menge an DNS auf dem Filter (= 100%) abgezogen; die verbleibende Menge wurde halb-logarithmisch gegen die Elutionszeit (h) aufgetragen. Für jede Kurve wurden Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen verwendet (siehe Anhang).

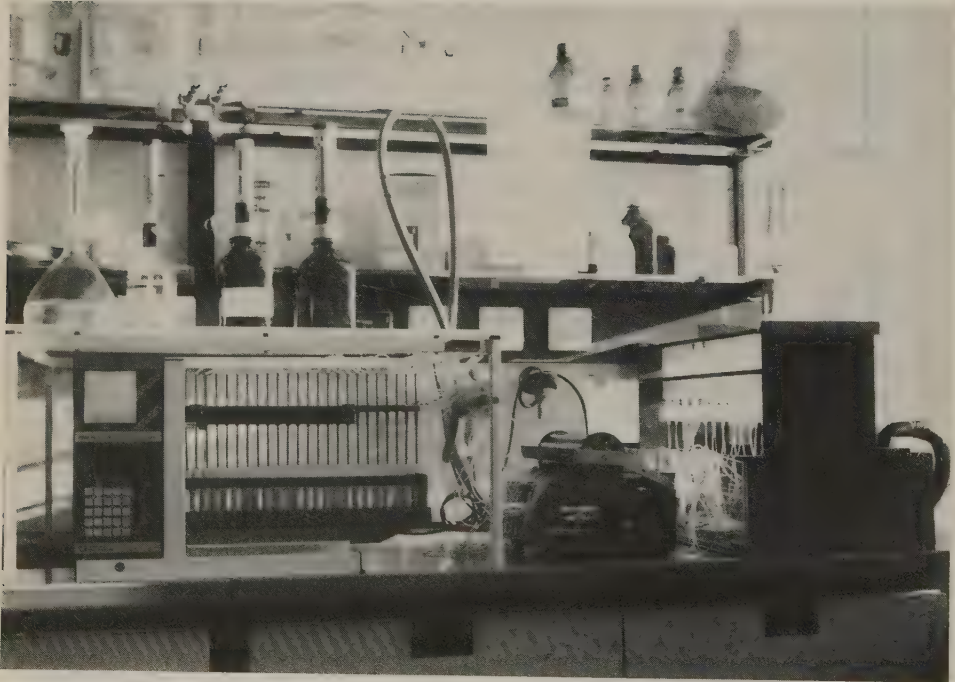


Abb. 4: Versuchsaufbau der alkalischen Filterelution

3.2 Versuche mit Diepoxybutan und Butadien

3.2.1 Exposition der Tiere im offenen System gegen Butadien

Mäuse (B6C3F1) wurden wie in 3.1.1 gegen 1,3-Butadien (2000 ppm, 24 h) exponiert. Phenol extrahierte und über Hydroxylapatit gereinigte DNS aus Lebern von Mäusen (B6C3F1) sowie Ratten (Sprague Dawley), die gegen 2000 ppm Butadien (8 h/Tag, 7 Tage) exponiert worden waren, stand aus früheren Versuchen im Institut zur Verfügung. Es wurden 6 Mäuse bzw. 3 Ratten/Versuch eingesetzt.

3.2.2 Präparative Methoden

3.2.3 Präparation von Zellkernen

Die Präparation von Zellkernen aus Lebern von unbehandelten und gegenüber 1,3-Butadien (2000 ppm, 24 h) exponierten Tieren erfolgte wie in 3.1.3.1.

3.2.2.2 Inkubation von Zellkernen mit Diepoxybutan

Zellkerne aus Lebern von unbehandelten Tieren wurden wie in 3.1.3.3 mit dem bifunktionell alkylierenden Diepoxybutan in einem Konzentrationsbereich von 10 μ M - 5,0 mM inkubiert, mit Natriumlauroylsarkosinat (4%) lysiert und einer einstündigen Proteinase K-Behandlung unterzogen (wie 3.1.3.2).

3.2.2.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.2.2.3.1 Phenolextraktion der Leberproben

Eine Isolierung von Nukleinsäuren aus Lebern von unbehandelten und gegenüber Butadien exponierten Mäusen und Ratten war zuvor von Dr. R. Laib durchgeführt worden und erfolgte nach der Methode von Beland et al. (1979), die jedoch insbesondere im Hinblick auf die Chromatographie (Hydroxylapatit) von Kreiling (1987) modifiziert worden war. Die Leber wurde hierzu mit einer Schere zerkleinert und dreimal in 8 Volumen

"Puffer 1" (8,0 M Harnstoff, 0,24 M Natriumphosphat, 10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) für 15 Sekunden im Ultra-Turrax zerkleinert. Nach jedem Zerkleinerungsvorgang wurde die homogene Suspension 1 min lang auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur gerührt, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen "Puffer 2" (Chloroform-Isoamylalkohol-Phenol, 24:1:25; mit "Puffer 1" gesättigt) versetzt und 30 min lang geschüttelt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (10,000 g, 4°C, 20 min). Aus der Emulsion entstanden durch die Zentrifugation zwei Phasen. Die wäßrige Oberphase wurde noch zweimal in gleicher Weise mit "Puffer 2" extrahiert. Phenolspuren in der wäßrigen Phase wurden dreimal durch Ausschütteln mit jeweils dem gleichen Volumen Diethylether entfernt. Die wäßrige Phase wurde anschließend der Hydroxylapatit-Chromatographie unterzogen.

3.2.2.3.2 Hydroxylapatit-Chromatographie

Hydroxylapatit (1 g HAP/mg erwarteter DNS) wurde in zehnfachem Volumen "Puffer 3" (Natriumphosphatpuffer; 0,014 M; pH 6,8) suspendiert. Nachdem sich der Hydroxylapatit abgesetzt hatte, wurde der Überstand entfernt und der HAP in fünffachem Volumen "Puffer 4" (8,0 M Harnstoff, 0,24 M Natriumphosphat, pH 6,8) suspendiert und in eine Glassäule gegeben. Nach dem Durchpumpen des "Puffers 4" wurde die wäßrige Phase mit einer Schlauchpumpe aufgetragen. Die nuklearen Proteine wurden mit zwei Säulenvolumina "Puffer 4" eluiert. Nachdem der Harnstoff von der Säule mit zwei Säulenvolumina "Puffer 3" gewaschen wurde, erfolgte die Elution der RNS und Einzelstrang-DNS mit dem zweifachen Säulenvolumen "Puffer 5" (Natriumphosphatpuffer; 0,2 M; pH 6,8). Schließlich wurden mit zwei Säulenvolumina "Puffer 6" (Natriumphosphatpuffer; 0,5 M; pH 6,8) die native doppelsträngige DNS erhalten. Die Fraktionierung der Makromoleküle erfolgte anhand der optischen Peaks bei 260 nm und 280 nm.

3.2.2.3.3 Ultrafiltration der Nukleinsäureproben

Die fraktionierten DNS-Proben wurden unmittelbar nach der Hydroxylapatit-Chromatographie gegen das vierfache Volumen aqua bidest. diafiltriert (Amicon Ultrafiltrationszellen 8050, Diaflo-Ultrafiltrationsmembran YM10), durch Ultrafiltration auf etwa 10 ml eingeengt und nach Bestimmung des DNS-Gehalts lyophilisiert.

3.2.2.4 Inkubation von gereinigter DNS mit Diepoxybutan

Ein Teil der Phenol-extrahierten und über HAP-Chromatographie gereinigten DNS (0,5 mg/ml) aus Lebern von unbehandelten Mäusen wurde unter gleichen Bedingungen wie die Zellkerne (3.2.2.2) mit Diepoxybutan behandelt.

3.2.2.5 Probenaufbereitung und CsTFA-Dichtegradientenzentrifugation

Das bifunktionell alkylierende Diepoxybutan ist wahrscheinlich ein Folgemetabolit von Butadien und möglicherweise für die DNS-DNS-Quervernetzungen verantwortlich, die nach Exposition von B6C3F1-Mäusen gegen Butadien ab einer Konzentration von 500 ppm in den Lebern dieser Tiere mit der alkalischen Filterelution nachgewiesen werden konnten (Vangala et al., 1987, 1989). Ziel der Inkubation von DNS beziehungsweise Zellkernen mit Diepoxybutan war, mit Hilfe der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation DNS-DNS-Quervernetzungen zu erfassen. DNS beziehungsweise Zellkerne aus Lebern von mit Butadien behandelten Tieren wurden ebenfalls auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin untersucht.

Die Proben (mit Diepoxybutan-behandelte DNS/ Zellkerne aus Mäuselebern oder DNS/Zellkerne aus Lebern von nicht-exponierten sowie mit Butadien-behandelten Mäusen oder Ratten) wurden mit 0,1 M NaOH auf pH 12 verdünnt und nach 4 min neutralisiert (Lawley und Brookes, 1967) oder kurzfristig

erhitzt und anschließend rasch abgekühlt. Eine Alkali-Behandlung oder Erhitzen der DNS hat eine Denaturierung (Trennung der beiden DNS-Einzelstränge) der DNS zur Folge. Neutralisierung nach der Alkali-Behandlung oder rasche Abkühlung nach dem Erhitzen der DNS führt zu weitgehend bleibender Denaturierung. Hingegen wird durch bifunktionell alkylierende Stoffe (wie z.B. Diepoxybutan), die zu einer Vernetzung der beiden DNS-Stränge führen können, eine vollständige Strangtrennung verhindert; durch die Neutralisierung oder beim Abkühlen kommt es wieder zu einer Renaturierung. Denaturierte und renaturierte DNS lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in einem CsTFA-Dichtegradienten trennen.

Die Proben wurden bei einer Extinktion (260 nm) von 1,2-1,5/0,5 ml wie in 3.1.3.4.3 in einem CsTFA-Gradienten ultrazentrifugiert und die Fraktionen auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin untersucht.

3.2.3 Alkalische Filterelution

Die mit Hilfe eines Nylonfilters gewonnenen Zellkerne aus Mäuseleber wurden mit Diepoxybutan wie in 3.2.2.2 inkubiert und anschließend wie in 3.1.6.2 einer alkalischen Filterelution unterzogen.

3.2.4 T_m -Wert ("temperature of melting")

Beim Erwärmen einer neutralen DNS-Lösung kommt es als Folge des Verlustes der Sekundärstruktur zu einer Extinktionszunahme (thermische Denaturierung). Die Temperatur, welche der Hälfte der maximalen Extinktionsanstieges entspricht, wird als T_m -Wert bezeichnet. Bei langsamem Abkühlen kommt es wieder zu einer Extinktionsabnahme (Renaturierung), die nach Einwirkung bifunktioneller Stoffe noch ausgeprägter ist.

Kalbsthymus-DNS wurde in 1 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,0 (+ 1 mM NaCl) mit Diepoxybutan wie in 3.2.2.4 inkubiert. Proben (0,5 ml) mit einer E_{260} von 0,4-0,5 wurden langsam von 25°C auf 85°C erwärmt und der Extinktionsanstieg bei der jeweiligen Temperatur vermerkt. Nach Abkühlung der Proben wurde die E_{260} bei 25°C erneut gemessen und die Extinktionsabnahme von Diepoxybutan-behandelter DNS mit der von Kontroll-DNS verglichen.

4

Ergebnisse

4.1

Versuche mit Methylchlorid

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit sollte Aufschluß darüber geben, ob zwischen dem Auftreten von Formaldehyd als Metabolit von Methylchlorid und der experimentell beobachteten Entstehung von Nierentumoren durch Methylchlorid ein Zusammenhang bestehen könnte. Höhere Konzentrationen an Formaldehyd verursachen DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellen von Eukaryonten.

Aus Metabolismusstudien von Jäger et al. (1988) ergaben sich selbst nach hoher Methylchloridbelastung (1000 ppm) keine Hinweise auf einen erhöhten Anstieg an freiem Formaldehyd in den untersuchten Geweben (Leber, Niere) exponierter Mäuse (B6C3F1). Jedoch muß in Betracht gezogen werden, daß in dem von Jäger et al. verwendeten Meßverfahren ein Teil des Formaldehyds dem Nachweis entzogen ist: Formaldehyd ist in der Lage, sehr schnell mit Zellbestandteilen (Nukleinsäuren, Proteinen) zu reagieren. Mit der von Jäger et al. verwendeten Meßmethode läßt sich gebundenes Formaldehyd im Gewebe nicht bestimmen.

Die vorliegenden Untersuchungen mit Methylchlorid und Formaldehyd zielten in erster Linie auf die Erfassung von DNS-Protein-Quervernetzungen. Der Nachweis dieser Primärläsionen in Nieren aus gegenüber Methylchlorid exponierten Mäusen (B6C3F1) würde für eine lokale Akkumulation von endogen gebildetem Formaldehyd sprechen. Gleichzeitig könnten derartige DNS-Schädigungen möglicherweise mit den tumorauslösenden Wirkungen von Methylchlorid in Verbindung gebracht werden.

Für die Detektion von DNS-Schädigungen wurden die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation mit CsTFA als Gradientenmedium sowie die alkalische Filterelution herangezogen.

4.2.1 Trennung von DNS und Protein mit Hilfe der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation

Im ersten Teil der Untersuchungen mit Methylchlorid kam für die Erfassung von DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellkernen exponierter Tiere die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation zum Einsatz. Caesiumtrifluoracetat (CsTFA) wurde als Gradientenmedium verwendet. Die Vorteile von CsTFA im Vergleich zu anderen Caesiumsalzen wurden bereits in 3.1.3.4.1 beschrieben.

Bei der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation ist für den Nachweis von DNS-Protein-Quervernetzungen in lytierten Zellkernen eine vollständige Trennung von Nukleinsäuren und dissoziierbaren Kernproteinen erforderlich.

In einem Vorversuch sollte untersucht werden, ob eine komplette Trennung von DNS und Protein in einem CsTFA-Gradienten erfolgen kann. Käufliche DNS aus Kalbsthymus (60 $\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$) und Rinderserumalbumin (250 $\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$) wurden einer isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen. Die besten Trennergebnisse konnten unter den in 3.1.3.4.3 beschriebenen Zentrifugationsbedingungen erzielt werden.

Abb. 5 gibt das Extinktionsprofil eines fraktionierten CsTFA-Gradienten wieder. Die Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen wurde in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Da CsTFA die Messung von Protein beeinträchtigte, wurden vor der Proteinbestimmung die Fraktionen mit Ethanol gefällt und in "Puffer D" (siehe 3.1.3.2) in einem den Fraktionen entsprechenden Volumen wieder aufgenommen. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde als Prozentsatz des Gesamtproteins aufgetragen (Abb. 5). Die Identität der Fraktionen konnte durch E_{260} sowie das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} bestätigt werden.

Eine vollständige Trennung von DNS und Protein wurde erreicht. Die UV-absorbierende Bande im mittleren Bereich des CsTFA-Gradienten stellte die DNS dar. Das Protein war in den Fraktionen mit der niedrigsten Dichte enthalten.

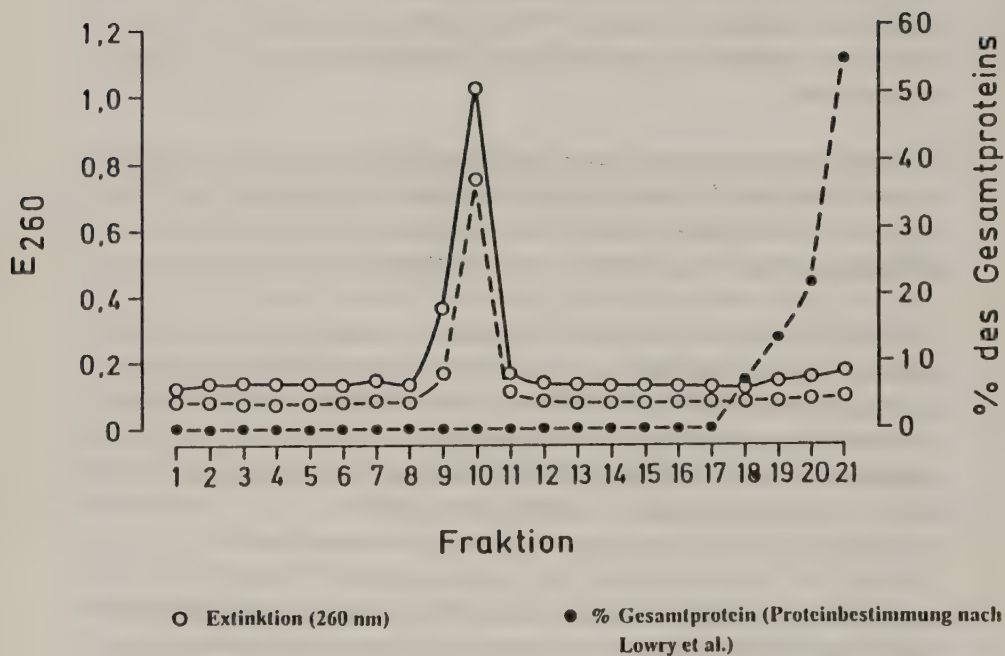


Abb. 5: Isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von Kalbsthymus DNS und Rinderserumalbumin; E_{260} wurde vor und nach Fällung mit Ethanol gemessen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951)

4.2.2 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen

Ziel dieses Versuches war, mit Hilfe der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation Kernproteine von den Nukleinsäuren in lysierten Zellkernen abzutrennen.

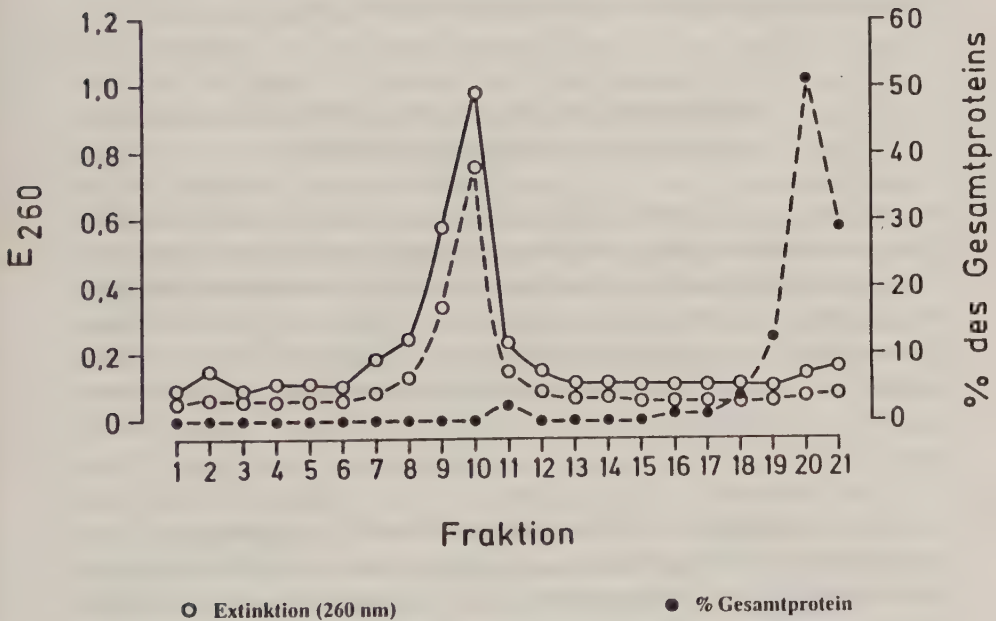


Abb. 6: Isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von lysierten Zellkernen aus Nieren von unbehandelten männlichen Mäusen (B6C3F1); E_{260} wurde vor und nach Fällung mit Ethanol gemessen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951)

Lysierte Zellkerne aus unbehandelten Tieren (Kontrollen) wurden wie in 3.1.3.4.3 einer isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen. Der Proteingehalt (siehe 3.1.4.2) sowie E_{260} und E_{280} der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} ermittelt. Abb. 6 gibt das Extinktionsprofil des fraktionierten CsTFA-Gradienten und den Prozentsatz des Gesamtproteins in den Fraktionen wieder. Eine komplette Trennung von DNS und Protein wurde bei der Gleichgewichtszentrifugation erreicht. Allerdings deutete das $E_{260}:E_{280}$ Verhältnis, das bei den DNS enthaltenden Fraktionen etwas unterhalb von 1,8 lag, auf geringfügige Proteinverunreinigungen der DNS hin.

4.2.3 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Formaldehyd behandelten Zellkernen

Formaldehyd verursacht DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellen. Bei diesen DNS-Protein-Quervernetzungen handelt es sich um "Methylen-Brücken", die durch ionische Reagenzien wie Natriumlauroylsarkosinat oder CsTFA nicht gespalten werden. Eine durch Formaldehyd modifizierte DNS sollte demnach aufgrund der an sie kovalent gebundenen Proteine eine andere Dichte in einem CsTFA-Gradienten aufweisen als proteinfreie DNS.

In den folgenden Untersuchungen sollte die Konzentration an Formaldehyd ermittelt werden, bei der sich noch DNS-Protein-Quervernetzungen in lysierten Zellkernen nach einem einzigen Zentrifugationsschritt nachweisen lassen. Nierenzellkerne männlicher Mäuse wurden mit verschiedenen Konzentrationen Formaldehyd behandelt (3.1.3.3) und einer anschließenden isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen (3.1.4.3.3).

Bei Zellkernen, die mit Formaldehydkonzentrationen unterhalb 2 % behandelt wurden, ließ sich kein Dichteunterschied zwischen der durch die Testsubstanz veränderten DNS und der nicht-modifizierten DNS im CsTFA-Dichtegradienten feststellen. Mit Hilfe der Methode nach Lowry et al. konnte al-

lerdings in mit 1 % Formaldehyd behandelten Zellkernen etwa 15 % des eingesetzten Proteins in den DNS enthaltenden Fraktionen gemessen werden. Abb. 7 gibt den Prozentsatz des Gesamtproteins in den DNS enthaltenden Fraktionen nach einer isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen wieder, die mit 1 % Formaldehyd inkubiert wurden. Innerhalb des DNS-Peaks stieg der Proteingehalt mit abnehmender Dichte des CsTFA-Gradienten an. Unterhalb Konzentrationen von 1 % Formaldehyd war mit der Methode nach Lowry et al. in den DNS enthaltenden Fraktionen kein Protein nachweisbar.

Erst nach Behandlung der Zellkerne mit 2 % Formaldehyd wies die DNS-Bande im CsTFA-Dichtegradienten eine Schulter auf. Dies wird in Abb. 8 verdeutlicht. Mit abnehmender Dichte des CsTFA-Gradienten stieg auch hier der prozentuale Gehalt an Protein innerhalb der DNS-Bande und der Schulter an, wobei in den DNS enthaltenden Fraktionen etwa 39 % des Gesamtproteins gemessen wurde. (Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al., 1951.) Dieses Protein entsprach wahrscheinlich Kernproteinen, die kovalent an die DNS gebunden waren. Das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} (Durchschnittswert = 1,55) der DNS enthaltenden Fraktionen lag wesentlich unter 1,8 und war ebenfalls mit DNS-Protein-Quervernetzungen vereinbar.

In mit Formaldehyd inkubierten Zellkernen bildet sich erst ab einer verhältnismäßig hohen Konzentration der Testsubstanz (2 %) eine Schulter im CsTFA-Dichtegradienten aus, die vermutlich durch an DNS kovalent gebundene Proteine zustande kommt. Offensichtlich sind unterhalb einer Formaldehydkonzentration von 2 % nicht genügend DNS-Protein-Quervernetzungen vorhanden, um eine Dichteverschiebung der DNS zu bewirken. In mit 1 % Formaldehyd behandelten Zellkernen war im CsTFA-Dichtegradienten zwar keine Schulter erkennbar, doch ließ sich auch hier Protein in den DNS enthaltenden Fraktionen nachweisen. Unterhalb Konzentrationen von 1 % der zu prüfenden Chemikalie (Formaldehyd) konnte kein Protein in den DNS enthaltenden Fraktionen gemessen werden.

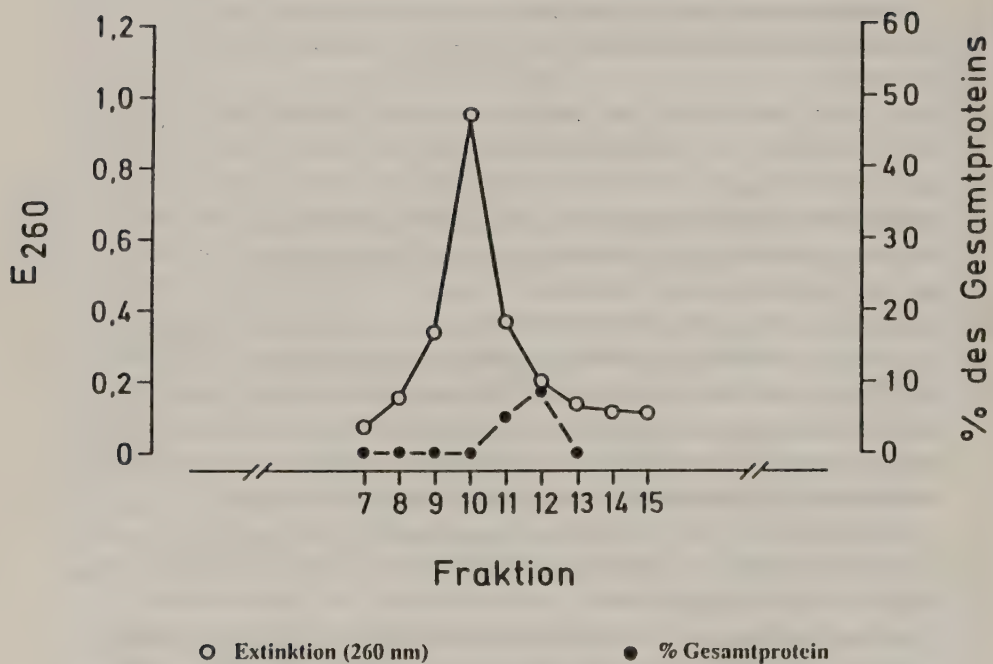


Abb. 7: Isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von mit 1 % Formaldehyd behandelten Zellkernen aus Nieren männlicher Mäuse (B6C3F1); die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951)

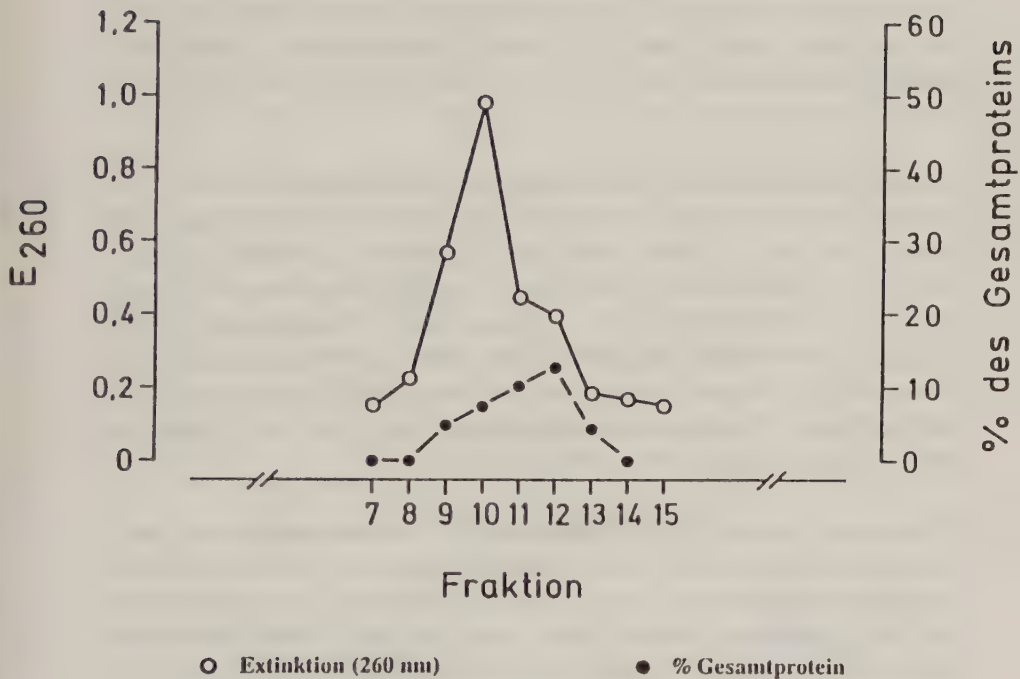


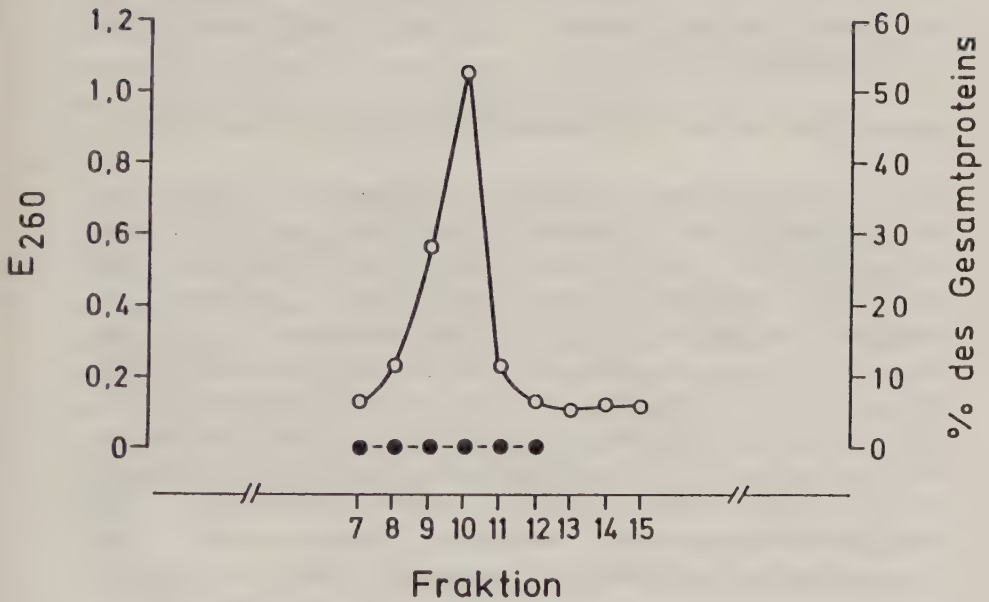
Abb. 8: Isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von mit 2 % Formaldehyd behandelten Zellkernen aus Nieren männlicher Mäuse (B6C3F1); die Extinktion der einzel-Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951)

4.2.4 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von lysierten Zellkernen aus Nieren von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen (B6C3F1)

In diesen Untersuchungen wurden für den Nachweis von DNS-Protein-Quervernetzungen Nierenzellkerne aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h/Tag) exponierten männlichen B6C3F1-Mäusen einer isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen.

Die DNS-Bande wies keine Schulter im CsTFA-Gradienten auf. In den DNS enthaltenden Fraktionen konnte mit der Methode nach Lowry et al. (1951) auch kein Protein gemessen werden (Abb.9). Das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} der DNS-Fraktionen lag etwas unterhalb 1,8. Diese Werte entsprachen dem $E_{260}:E_{280}$ Verhältnis der DNS enthaltenden Fraktionen von unbehandelten Mäusenierenzellkernen und wurden zunächst auf geringfügige Proteinverunreinigungen der DNS und nicht auf DNS-Protein-Quervernetzungen zurückgeführt.

Allerdings ergaben die vorhergehenden Untersuchungen mit Formaldehyd (siehe 4.2.3), daß die isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von lysierten Zellkernen in Verbindung mit der Proteinbestimmung nach Lowry et al. keine geeignete Methode für die Erfassung geringer Mengen an DNS-Protein-Quervernetzungen ist. Unterhalb 1 % Formaldehyd konnten mit dieser Methode keine DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellkernen gemessen werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, daß DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellen auftraten, die mit Formaldehyd im mikromolaren Konzentrationsbereich inkubiert wurden. So konnten beispielsweise Grafstrom et al. (1983) mit Hilfe der alkalischen Elution DNS-Protein-Quervernetzungen in Bronchialzellen bereits ab einer Konzentration von 100 μ M Formaldehyd feststellen.



○ Extinktion (260 nm)

● % Gesamtprotein

Abb. 9: Isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation von Zellkernen aus Nieren von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen B6C3F1-Mäusen; die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951)

4.3 Alkalische Filterelution

Die alkalische Filterelution gilt als eine sehr empfindliche Methode zur Erfassung primärer DNS-Schäden, die durch Fremdstoffe ausgelöst wurden. Mit dieser Technik lassen sich in vitro noch bei Konzentrationen von 100 μM Formaldehyd DNS-Protein-Quervernetzungen in Zellen nachweisen (Kohn, 1983; Grafstrom et al., 1983).

Die Analyse der DNS-Schädigungen wird wie folgt durchgeführt:

Unter denaturierenden alkalischen Bedingungen wird die auf Polycarbonatfiltern liegende DNS lysierter Zellkerne (oder Zellen) eluiert. Eine erhöhte Elutionsgeschwindigkeit der durch eine Testsubstanz modifizierten DNS im Vergleich zur unbehandelten DNS weist auf Einzelstrangbrüche hin. Verzögerte Elutionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle deutet entweder auf DNS-DNS- oder DNS-Protein-Quervernetzungen hin. Durch eine Behandlung mit Proteinase K nach Bestrahlung der Zellkerne, die eine statistische Verteilung von Einzelstrangbrüchen ergibt, lassen sich DNS-Protein- und DNS-DNS-Quervernetzungen voneinander unterscheiden. Sind DNS-Protein-Quervernetzungen vorhanden, müßte eine derartig veränderte DNS langsamer vom Filter eluiert werden als eine DNS, die durch die Testsubstanz nicht modifiziert wurde. Durch eine Behandlung mit Proteinase K wird das an die DNS kovalent gebundene Protein entfernt und der Unterschied in der Elutionsgeschwindigkeit verschwindet. Wenn trotz der Behandlung mit Proteinase K die durch den Fremdstoff modifizierte DNS langsamer eluiert wird als die Kontrolle, weist dieses Verhalten auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin.

Um die hiermit im Zusammenhang stehende Frage möglicher DNS-Protein-Quervernetzungen in den Nieren männlicher Mäuse (B6C3F1) durch intermediär gebildeten Formaldehyd nach hoher Methylchloridbelastung (1000 ppm) zu klären, wurde DNS aus lysierten Zellkernen exponierter Mäuse mit der Elutionstechnik auf die für Formaldehyd charakteristischen DNS-Läsionen hin untersucht.

4.3.1 Alkalische Elution von DNS aus Nieren und Lebern von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten B6C3F1-Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition

Sechs männliche und sechs weibliche B6C3F1-Mäuse wurden gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponiert und DNS aus Nieren- und Leberzellkernen von den exponierten sowie jeweils sechs unbehandelten Tieren der alkalischen Elution unterworfen.

Weder in Lebern von Mäusen beiderlei Geschlechts noch in Nieren weiblicher Tieren ließen sich Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen feststellen. Abb. 10 zeigt das Elutionsverhalten von DNS aus Leberzellkernen von unbehandelten und gegenüber Methylchlorid exponierten männlichen Mäusen. Der Elutionsverlauf von DNS aus exponierten Tieren und Kontroll-DNS ist nach der Bestrahlung (600 rad) der Zellkerne fast identisch. DNS aus Lebern und Nieren weiblicher Mäuse wies ein ähnliches Elutionsverhalten auf wie DNS aus Lebern männlicher Tiere.

Abb. 11 gibt den Elutionsverlauf von DNS aus Nieren exponierter männlicher Mäuse (B6C3F1) wieder. Der Vergleich erfolgte mit Nierenzellkernen aus unbehandelten Tieren. Die Elutionsgeschwindigkeit der Nieren-DNS aus exponierten Mäusen ist niedriger als die der Kontrolle. Auch nach Bestrahlung der Zellkerne wird die DNS aus exponierten Tieren deutlich langsamer eluiert als die DNS aus unbehandelten Tieren; nach einer Behandlung mit Proteinase K verläuft die Elution von Kontroll-DNS und DNS aus exponierten Tieren fast gleich. Dieses Verhalten der DNS läßt auf DNS-Protein-Quervernetzungen schließen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß es unter einer hohen Methylchloridbelastung (1000 ppm, 8 h) ausschließlich in den Nieren männlicher Mäuse (B6C3F1) zur Bildung von DNS-Protein-Quervernetzungen kommen kann. Die Elutionstechnik

scheint für die Erfassung von DNS-Protein-Quervernetzungen im Vergleich zur isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation wesentlich empfindlicher zu sein.

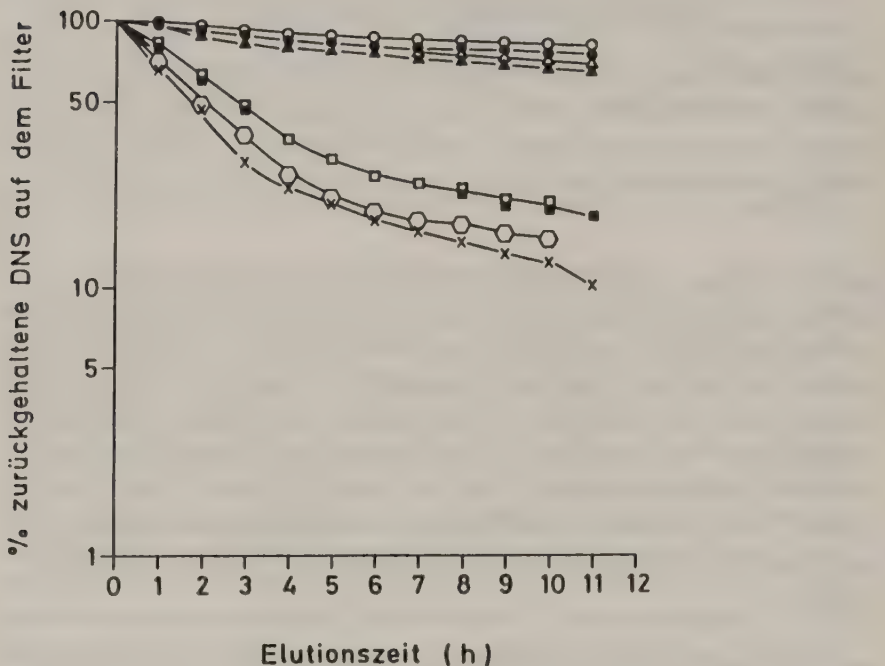


Abb. 10: Alkalische Elution von DNS aus Leberzellkernen von sechs gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen (B6C3F1) und sechs unbehandelten Tieren (Kontrollen); die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen; für jede Kurve wurden Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen verwendet (siehe auch Tab. 2, Anhang)

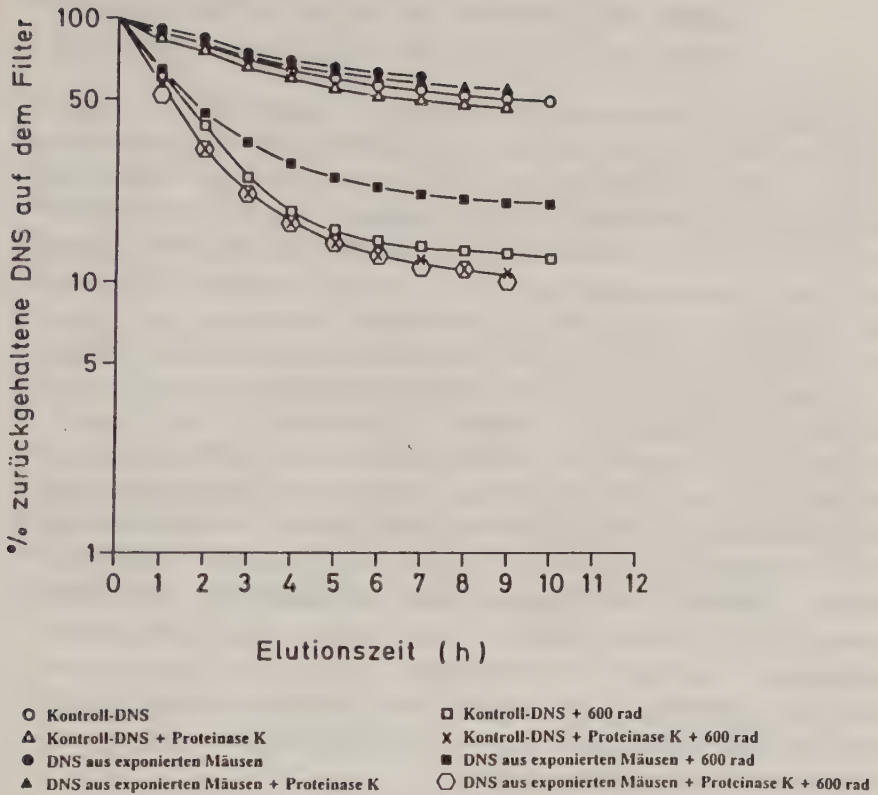


Abb. 11: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe auch Tab. 3)

4.3.2 Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen B6C3F1-Mäusen; die Tötung der Tiere erfolglos unmittelbar bzw. 5 h oder 48 h nach der Exposition

Den vorangegangenen Untersuchungen von Jäger et al. (1988) zufolge gab es keine Hinweise auf DNS-Protein-Quervernetzungen in Nierenzellkernen aus männlichen gegenüber 1000 ppm Methylchlorid exponierten B6C3F1-Mäusen. Mit Hilfe der alkalischen Elution ließen sich in diesem Versuch nur Anzeichen von DNS-Einzelstrangbrüchen in den Nieren erkennen. Aufgrund des Fehlens von DNS-Protein-Quervernetzungen wurde von Jäger und Mitarbeitern (1988) dem Formaldehyd als Zwischenprodukt von Methylchlorid keine wesentliche Bedeutung für die beobachteten gentoxischen Effekte beigemessen. Die Einzelstrangbrüche wurden auf die Wirkungen reaktiver Sauerstoffradikale zurückgeführt, die nach Absinken des intrazellulären Glutathionspiegels vermehrt auftreten können. Allerdings waren in diesem Experiment die Tiere aus äußeren experimentellen Gründen erst 5 Stunden nach der Exposition gegenüber Methylchlorid getötet worden. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, daß während dieses Zeitintervalles (zwischen Beendigung der Exposition gegenüber Methylchlorid und der Tötung der Tiere) eine Reparatur von DNS-Protein-Verknüpfungen stattgefunden hatte.

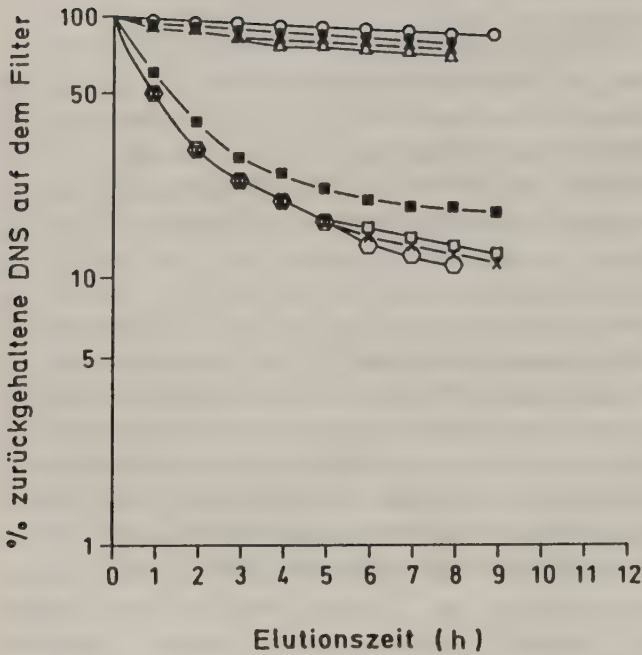
Um diese Frage zu klären, wurde DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber 1000 ppm Methylchlorid exponierten männlichen Mäusen der alkalischen Elution unterworfen, wobei ein Teil der Tiere unmittelbar, ein anderer Teil 5 Stunden und ein weiterer Teil 48 Stunden nach der Exposition getötet wurde.

Aus dem Elutionsverhalten der DNS aus Nieren männlicher Mäuse, die unmittelbar nach der Exposition getötet wurden, ließen sich Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen erkennen. Dies wird in Abb. 12 verdeutlicht: Nach Bestrahlung der Zellkerne wurde die DNS exponierter Tiere deutlich langsamer eluiert als die DNS unbehandelter Mäuse, während die Elution von

Kontroll-DNS und DNS aus exponierten Tieren nach Behandlung mit Proteinase K praktisch gleich verlief. Dieser Versuch lieferte ein ähnliches Ergebnis wie 4.3.1.

5 Stunden nach der Exposition ergaben sich aus dem Elutionsverlauf der DNS von mit Methylchlorid behandelten Mäusen keine Hinweise auf DNS-Protein-Quervernetzungen. Das Elutionsverhalten der modifizierten DNS wies im Vergleich zur unbehandelten DNS lediglich auf DNS-Einzelstrangbrüche hin (Abb. 13): Die DNS aus exponierten Tieren wurde schneller eluiert als die Kontrolle.

48 Stunden nach der Exposition konnte aus dem Elutionsverhalten der DNS aus exponierten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14) weder auf DNS-Protein-Quervernetzungen noch auf DNS-Einzelstrangbrüche geschlossen werden. Dieser Befund deutete darauf hin, daß sich 48 Stunden nach der Exposition gegenüber Methylchlorid eine komplette Reparatur der durch Formaldehyd (als wahrscheinliches Folgeprodukt von Methylchlorid) verursachten DNS-Läsionen vollzogen hatte.



- | | |
|---|---|
| ○ Kontroll-DNS | □ Kontroll-DNS + 600 rad |
| △ Kontroll-DNS + Proteinase K | × Kontroll-DNS + Proteinase K + 600 rad |
| ● DNS aus exponierten Mäusen | ■ DNS aus exponierten Mäusen + 600 rad |
| ▲ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K | ○ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K + 600 rad |

Abb. 12: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe Tab. 4)

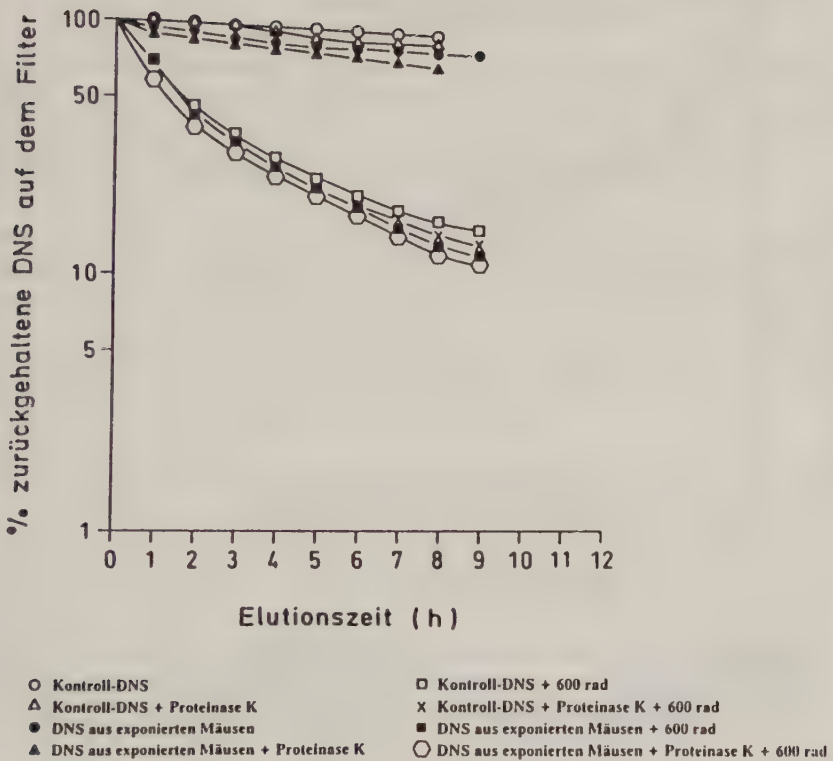
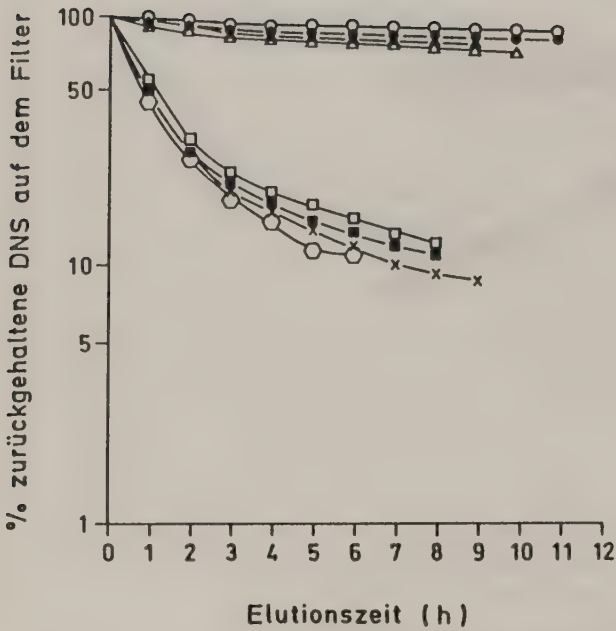


Abb. 13: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 5 h nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe auch Tab. 5)



- | | |
|---|---|
| ○ Kontroll-DNS | □ Kontroll-DNS + 600 rad |
| △ Kontroll-DNS + Proteinase K | x Kontroll-DNS + Proteinase K + 600 rad |
| ● DNS aus exponierten Mäusen | ■ DNS aus exponierten Mäusen + 600 rad |
| ▲ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K | ○ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K + 600 rad |

Abb. 14: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 48 h nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe Tab. 6)

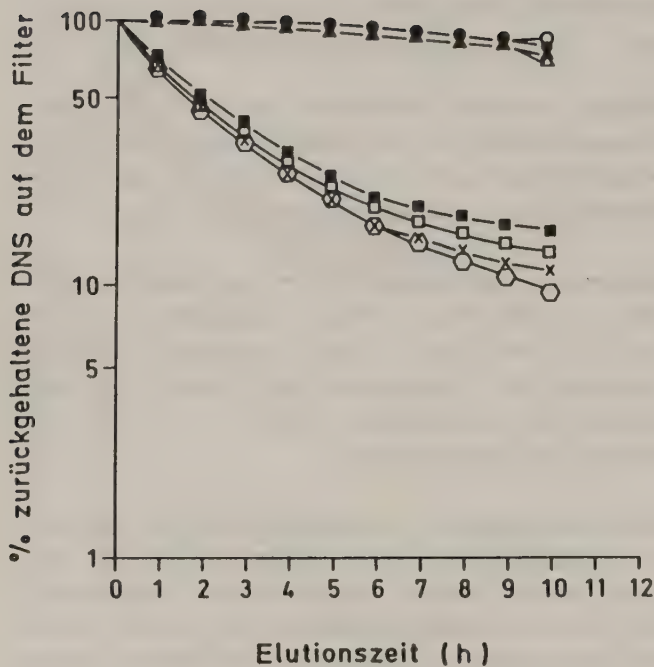
4.3.3 Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen B6C3F1-Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar bzw. 5 h nach der Exposition

Diese Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, wie sich eine mehrtägige Exposition von männlichen Mäusen gegenüber 1000 ppm Methylchlorid im Vergleich zu einer eintägigen Exposition hinsichtlich gentoxischer Effekte auswirkt.

DNS aus Nierenzellkernen von unbehandelten und gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten Tieren wurde (wie in 4.2.1.1 und 4.2.1.2) der alkalischen Elution unterworfen. Ein Teil der Tiere wurde unmittelbar und der andere Teil 5 h nach der Exposition getötet und die Nieren-DNS auf DNS-Läsionen hin untersucht.

Die DNS aus Nieren von mehrfach exponierten Mäusen, die unmittelbar nach der Exposition getötet wurden, wies nach Bestrahlung (600 rad) der Zellkerne ein ähnliches Elutionsverhalten auf wie die von nur einmalig exponierten Tieren, deren Tötung ebenfalls unmittelbar nach der Exposition erfolgte (Abb. 11, Abb. 12). Da die modifizierte DNS nach Bestrahlung der Zellkerne langsamer eluiert wurde als die Kontrolle, der Elutionsverlauf der modifizierten DNS mit dem der Kontrolle nach einer Behandlung mit Proteinase K jedoch fast identisch war (Abb. 15), konnte auch hier auf DNS-Protein-Quervernetzungen geschlossen werden; allerdings waren diese DNS-Protein-Quervernetzungen nur andeutungsweise erkennbar.

5 h nach Ablauf der Methylchloridexposition gleicht das Elutionsverhalten der DNS aus Nierenzellkernen von mehrtägig exponierten Mäusen (Abb. 16) dem Elutionsverhalten von DNS aus nur einmalig exponierten Mäusen (Abb. 13). Aus dem Elutionsverlauf der modifizierten DNS im Vergleich zur Kontrolle ließen sich nur Anzeichen von DNS-Einzelstrangbrüchen, nicht aber von DNS-Protein-Quervernetzungen erkennen.



- | | |
|---|---|
| ○ Kontroll-DNS | □ Kontroll-DNS + 600 rad |
| △ Kontroll-DNS + Proteinase K | × Kontroll-DNS + Proteinase K + 600 rad |
| ● DNS aus exponierten Mäusen | ■ DNS aus exponierten Mäusen + 600 rad |
| ▲ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K | ○ DNS aus exponierten Mäusen + Proteinase K + 600 rad |

Abb. 15: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (Tab. 7)

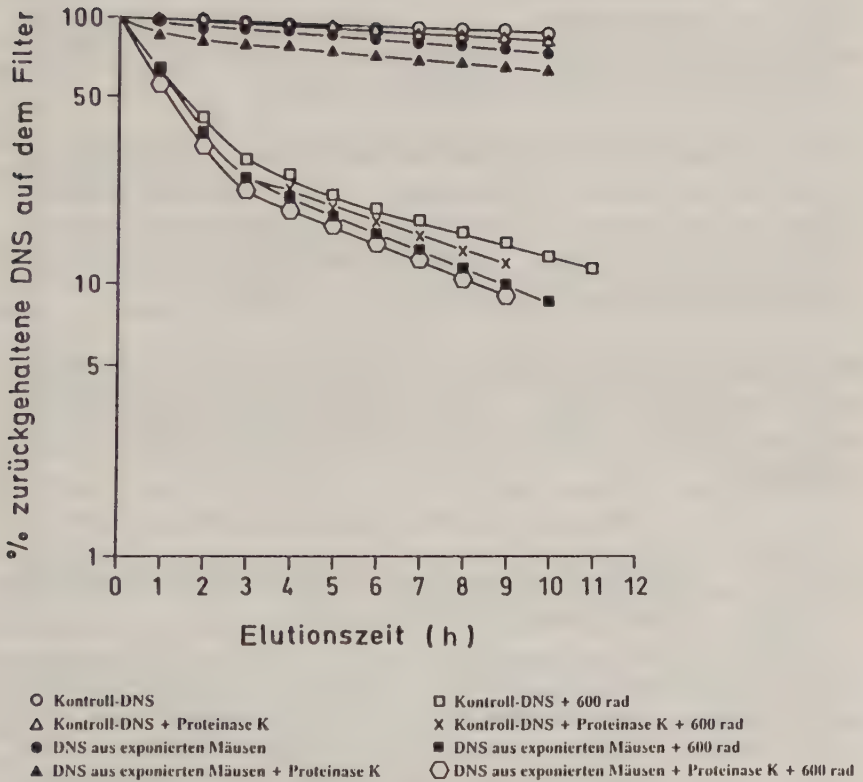


Abb. 16: Alkalische Elution von DNS aus Nierenzellkernen von gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 5 h nach der Exposition; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe Tab. 8)

4.4

Versuche mit Diepoxybutan

Diepoxybutan ist wahrscheinlich ein Folgemetabolit von Butadien und möglicherweise für die DNS-DNS-Quervernetzungen (und DNS-Protein-Quervernetzungen) verantwortlich, die nach Exposition von B6C3F1-Mäusen gegen Butadien ab einer Konzentration von 500 ppm mit der alkalischen Filterelution von Vangala et al. (1987, 1989) nachgewiesen wurden.

Ziel der Inkubationen von DNS beziehungsweise Zellkernen aus Lebern von Mäusen mit Diepoxybutan war, mit Hilfe physikochemischer Methoden (isopyknische Gleichgewichtszentrifugation, alkalische Elution, Schmelzkurvenverhalten) durch den Stoff hervorgerufene DNS-Läsionen zu erfassen.

DNS beziehungsweise Zellkerne aus Lebern von mit Butadien-behandelten Mäusen wurden ebenfalls mittels der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin untersucht.

4.4.1 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Diepoxybutan behandelten DNS

Der Dichteunterschied zwischen nativer DNS und DNS, deren beide Stränge durch bifunktionell alkylierende Stoffe vernetzt sind, ist nicht ausreichend, um eine Trennung der nativen und der modifizierten DNS mittels der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation zu erzielen. Durch folgende Vorbehandlung der nativen und modifizierten DNS lassen sich jedoch Kontroll-DNS und durch bifunktionell alkylierende Stoffe möglicherweise vernetzte DNS voneinander unterscheiden: Eine Behandlung mit Alkali oder Erhitzen der nativen DNS hat eine Dissoziation der beiden DNS-Stränge zur Folge (siehe 3.2.2.5). Eine Neutralisierung oder rasche Abkühlung der DNS-Lösung führt zu einer weitgehend bleibenden Denaturierung der DNS. Hingegen wird durch bifunktionell alkylierende Stoffe eine Strangtrennung verhindert. Durch die Neutralisierung oder Abkühlung kommt es wieder zur Reassoziierung der beiden DNS-Stränge. Denaturierte und renaturierte DNS lassen sich

aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in einem CsTFA-Gradienten trennen, wobei die Dichte der durch bifunktionelle Stoffe modifizierten renaturierten DNS der Dichte nativer doppelsträngiger DNS entsprechen müßte.

Mit Phenol extrahierte und über Hydroxylapatit gereinigte DNS aus Mäuselebern wurde nach Inkubation mit Diepoxybutan (siehe 3.2.2.4) wie in 3.2.2.5 aufbereitet und anschließend einer isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen (siehe 3.1.3.4.3).

Abb. 17 zeigt das Absorptionsprofil (260 nm) eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von mit verschiedenen Konzentrationen an Diepoxybutan (0,0-5,0 mM) inkubierter DNS. Die Denaturierung der DNS erfolgte durch Behandlung mit Alkali. Mit steigenden Konzentrationen an Diepoxybutan kam es zu einer deutlichen Ausbildung einer zweiten Bande ("Peak II"). Die Dichte der einen Bande ("Peak I") war mit der denaturierter DNS identisch, während die Dichte der zweiten Bande ("Peak II") eher der Dichte nativer unbehandelter DNS entsprach und vermutlich die unter Beisein von Diepoxybutan nicht denaturierte DNS darstellte. Allerdings nahm die zweite Bande ("Peak II") nicht genau die gleiche Position im CsTFA-Dichtegradienten ein wie die native doppelsträngige DNS. Unterhalb einer Konzentration von 0,050 mM Diepoxybutan war nur eine einzige UV-absorbierende Bande ("Peak I") erkennbar, deren Dichte mit der von denaturierter DNS identisch war.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß zwischen DNS und dem bifunktionellen alkylierenden Reagenz Diepoxybutan eine Reaktion stattgefunden hatte, die eine Bildung von DNS-DNS-Quervernetzungen zur Folge hatte. Der beobachtete Dichteunterschied zwischen "Peak II" und nativer DNS wurde auf eine unvollständige Renaturierung der mit Diepoxybutan reagierenden DNS zurückgeführt. DNS-DNS-Quervernetzungen konnten so bis zu einer Konzentration von 0,05 mM Diepoxybutan nachgewiesen werden.

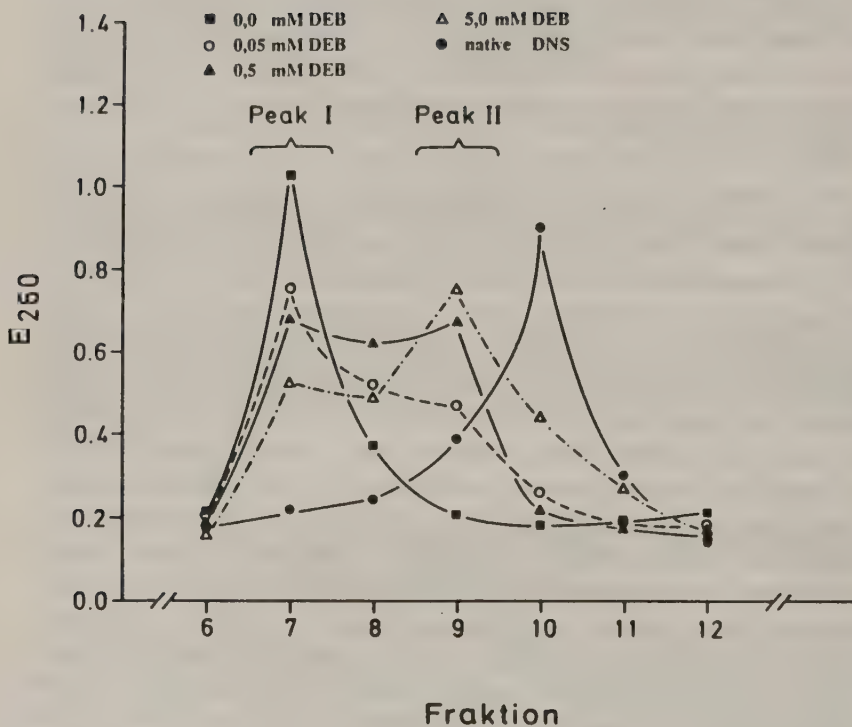


Abb. 17: Extinktionsprofil (260 nm) eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von mit Diepoxybutan behandelter DNS aus Mäuseleber; die Denaturierung der DNS erfolgte durch eine Behandlung mit Alkali

4.4.2 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von mit Diepoxybutan behandelten Zellkernen

Ziel dieses Versuches war, mittels der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation DNS-DNS-Quervernetzungen in Zellkernen zu erfassen, die vorher mit Diepoxybutan behandelt worden waren.

Zellkerne aus Mäuselebern wurden nach einer Inkubation mit Diepoxybutan in einem Konzentrationsbereich von 0,0 mM- 5,0 mM (siehe 3.2.2.1) lysiert und anschließend einer Behandlung mit Proteinase K wie in 3.2.2.2 unterzogen. Eine Vorbehandlung der Proben wie in 3.2.2.5 erfolgte unmittelbar vor der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation. Anschließend wurde die DNS mittels der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin untersucht.

Abb. 18 zeigt das Absorptionsprofil eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von lysierten Zellkernen, die mit Diepoxybutan vorbehandelt worden waren. Die Denaturierung der DNS erfolgte durch Behandlung mit Alkali. Bei allen getesteten Konzentrationen an Diepoxybutan konnte nur eine einzige UV-absorbierende Bande identifiziert werden. Bei niedrigeren Konzentrationen an Diepoxybutan stimmte die Dichte dieser Bande mit der von denaturierter DNS überein. Bei höheren Konzentrationen an Diepoxybutan (ab 0,5 mM) wurde diese Bande breiter und verschob sich zugunsten der nativen unbehandelten DNS.

Auch als eine kurzfristige Hitzebehandlung als denaturierendes Agens eingesetzt wurde, kam es zu keiner Auflösung der durch Diepoxybutan modifizierten und der nicht-modifizierten DNS in zwei Banden (Abb. 19). Auch hier fand lediglich eine Verschiebung der UV-absorbierenden Bande ab einer Konzentration von 0,5 mM Diepoxybutan statt.

Obwohl keine Auflösung der DNS in zwei Banden erfolgte, deutete eine Verschiebung der UV-absorbierenden Bande bei höheren Diepoxybutankonzentrationen darauf hin, daß es auch in den Zellkernen zu einer Reaktion zwischen DNS und Diepoxybu-

tan gekommen sein konnte. Möglicherweise läßt sich die mangelnde Auflösung u.a. auf zusätzliche Reaktionen zwischen Diepoxybutan und anderen Zellkernbestandteilen zurückführen.

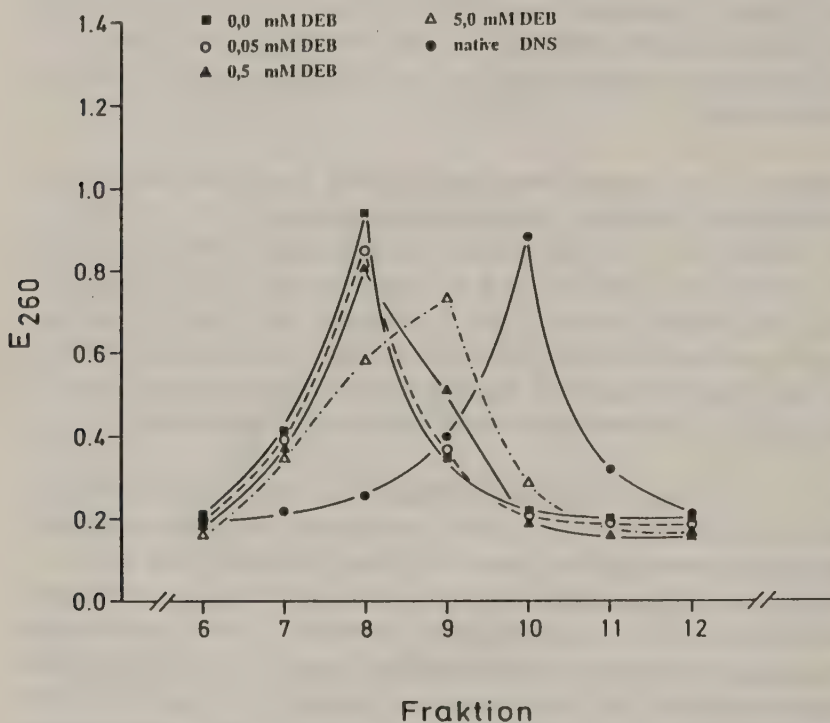


Abb. 18: Extinktionsprofil (260 nm) eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von mit Diepoxybutan behandelten Zellkernen aus Mäuseleber; die Denaturierung der DNS erfolgte durch eine Behandlung mit Alkali

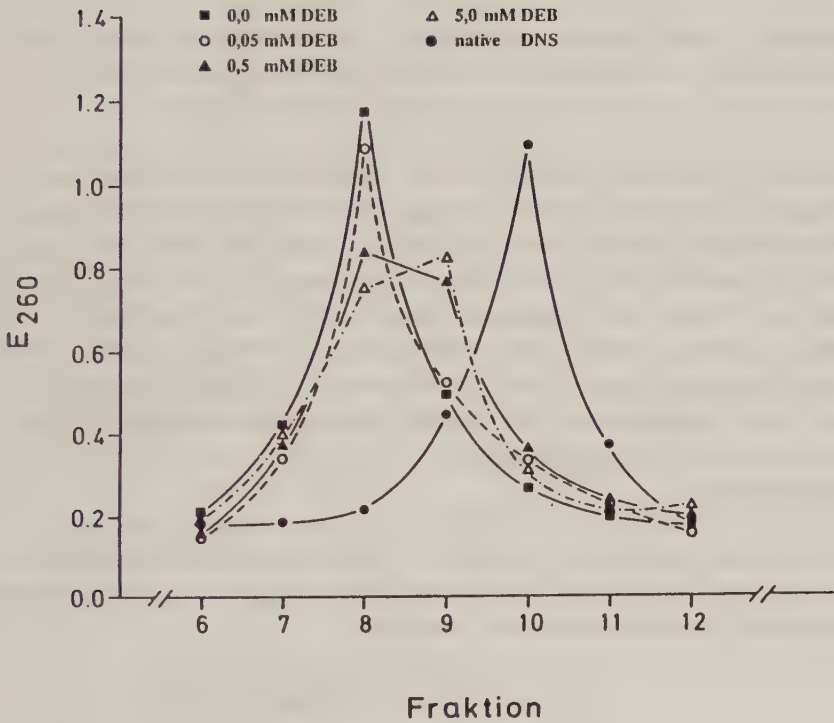


Abb. 19: Extinktionsprofil (260 nm) eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von mit Diepoxybutan behandelten Zellkernen aus Mäuseleber; die Denaturierung der DNS erfolgte durch eine Hitzebehandlung

4.4.3 Isopyknische Gleichgewichtszentrifugation von DNS aus Lebern von gegenüber Butadien (2000 ppm, 8 h/Tag, 7 Tage) exponierten Mäusen (B6C3F1) und Ratten (Sprague Dawley)

Die DNS aus Lebern von gegenüber Butadien exponierten Mäusen (B6C3F1) und Ratten (Sprague Dawley) wurde nach entsprechender Vorbehandlung auf die für Diepoxybutan charakteristischen DNS-DNS-Quervernetzungen hin untersucht.

Weder bei Mäusen noch bei Ratten ließen sich nach einer mehr-tägigen hohen Butadienbelastung Anzeichen von DNS-DNS-Quervernetzungen in der Leber erkennen. Abb. 20 zeigt das E_{260} -Profil eines fraktionierten CsTFA-Gradienten von gereinigter DNS aus Lebern von unbehandelten und mit 1,3-Butadien (2000 ppm, 8 h/Tag, 7 Tage) behandelten Mäusen. Die DNS wurde durch eine Behandlung mit Alkali denaturiert. Die Position der Bande von denaturierter DNS aus Kontrolltieren stimmt mit der von exponierten Mäusen überein. Bei Ratten lag ein ähnlicher Befund vor.

Es gab auch keinerlei Hinweise auf DNS-DNS-Quervernetzungen in der DNS aus Lebern von Mäusen (B6C3F1), die 24 h gegenüber 2000 ppm Butadien exponiert wurden.

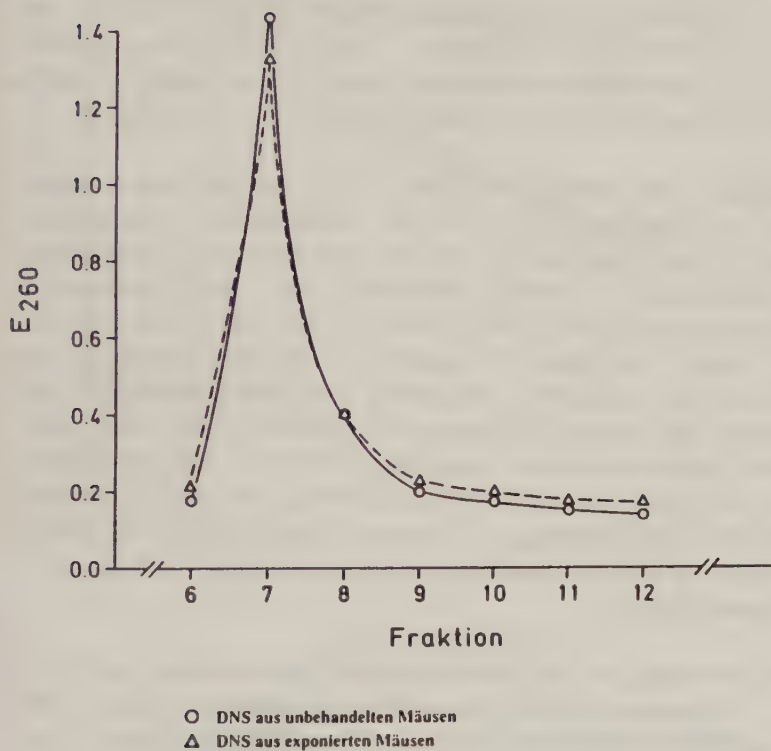


Abb. 20: Extinktionsprofil (260 nm) eines fraktionierten CstFA-Gradienten von DNS aus Lebern von gegenüber Butadien (2000 ppm, 8 h/Tag, 7 Tage) exponierten Mäusen; die Denaturierung erfolgte durch Behandlung mit Alkali

4.5.1 Alkalische Filterelution von DNS aus mit Diepoxybutan behandelten Leberzellkernen von Mäusen (B6C3F1)

Die nächsten Untersuchungen wurden dahingehend konzipiert, durch Diepoxybutan verursachte DNS-Läsionen mit Hilfe der alkalischen Elution zu erfassen. DNS aus mit Diepoxybutan behandelten Mäuseleberzellkernen (siehe 3.2.3) wurde mittels der alkalischen Elution auf DNS-Schäden hin untersucht.

Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21) läßt das Elutionsverhalten der DNS aus mit 1,0 mM Diepoxybutan behandelten (unbestrahlten) Zellkernen (Abb. 22) nach einer Behandlung mit Proteinase K nicht eindeutig auf die erwarteten DNS-Einzelstrangbrüche schließen, die von Vangala et al. (1987, 1989) in Lebern von gegenüber Butadien exponierten Tieren beobachtet wurden. Hingegen wird nach Bestrahlung der Zellkerne die durch Diepoxybutan veränderte und mit Proteinase K behandelte DNS schneller eluiert als die modifizierte und ohne Proteinase K behandelte DNS und langsamer eluiert als die Kontrolle. Dieses Verhalten der DNS deutet gleichzeitig auf DNS-DNS-Quervernetzungen und DNS-Protein-Quervernetzungen hin.

Die DNS aus mit 0,10 mM Diepoxybutan behandelten Zellkernen (Abb. 23) weist ein ähnliches Elutionsverhalten auf wie die DNS von mit 1,0 mM Diepoxybutan behandelten Zellkernen (Abb. 22). Erwartungsgemäß treten hier weniger DNS-DNS- und DNS-Protein-Quervernetzungen auf als bei der mit der höheren Konzentration an Diepoxybutan behandelten DNS. Ebenso gibt es bei mit 0,01 mM Diepoxybutan behandelter DNS noch deutliche Anzeichen beider Arten von Quervernetzungen (Abb. 24).

Mit der alkalischen Elution ließen sich bis zu einer Konzentration von 0,01 mM Diepoxybutan deutlich erkennbare DNS-DNS-Quervernetzungen nachweisen. Vergleichbare Untersuchungen mit Zellkernen ergaben, daß die isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation für den Nachweis von DNS-DNS-Quervernetzungen etwa fünfzigmal weniger empfindlich ist als die alkalische Elution (siehe 4.4.2).

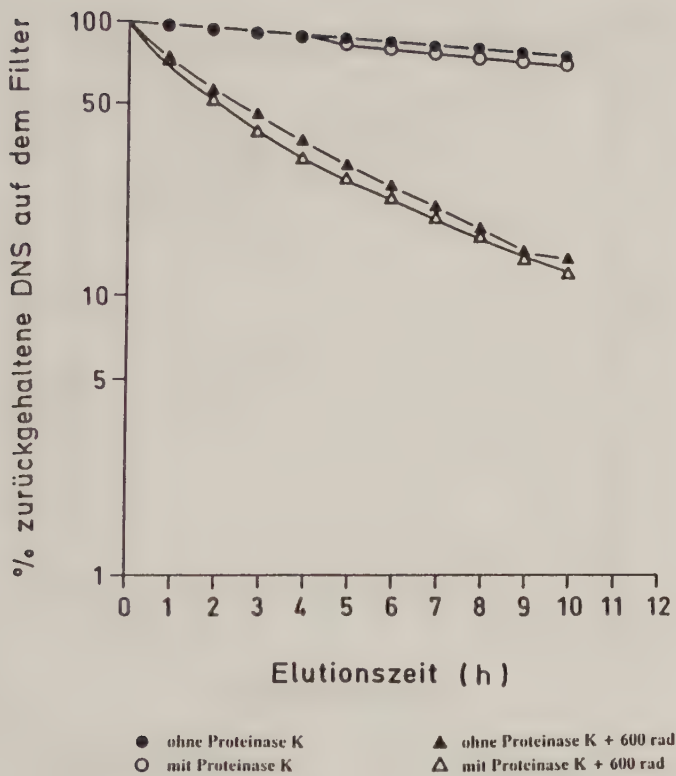


Abb. 21: Alkalische Elution von DNS aus unbehandelten Zellkernen aus Mäuselebern; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (siehe auch Tab. 9)

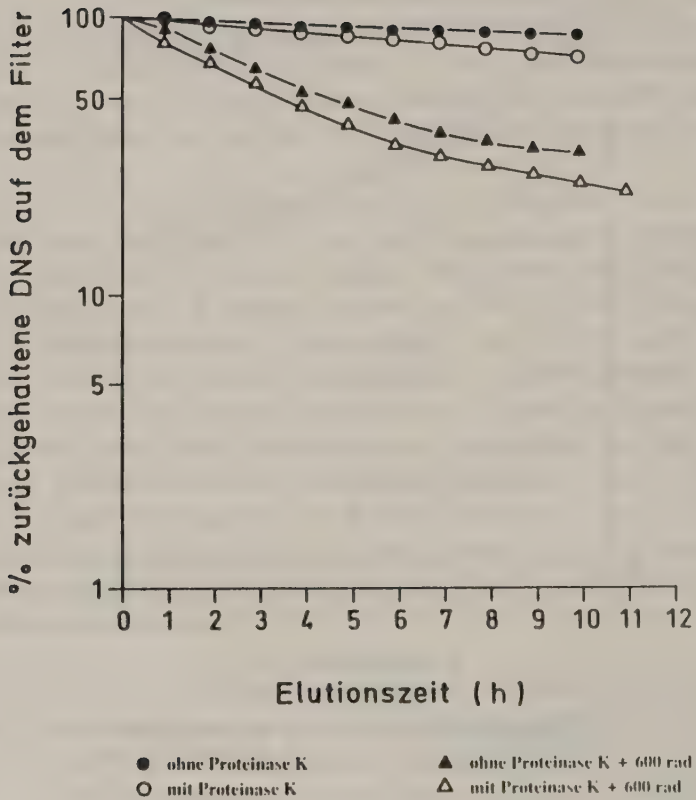


Abb. 22: Alkalische Elution von DNS aus mit 1,0 mM Diepoxybutan behandelten Zellkernen aus Mäuselebern; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (Tab. 12)

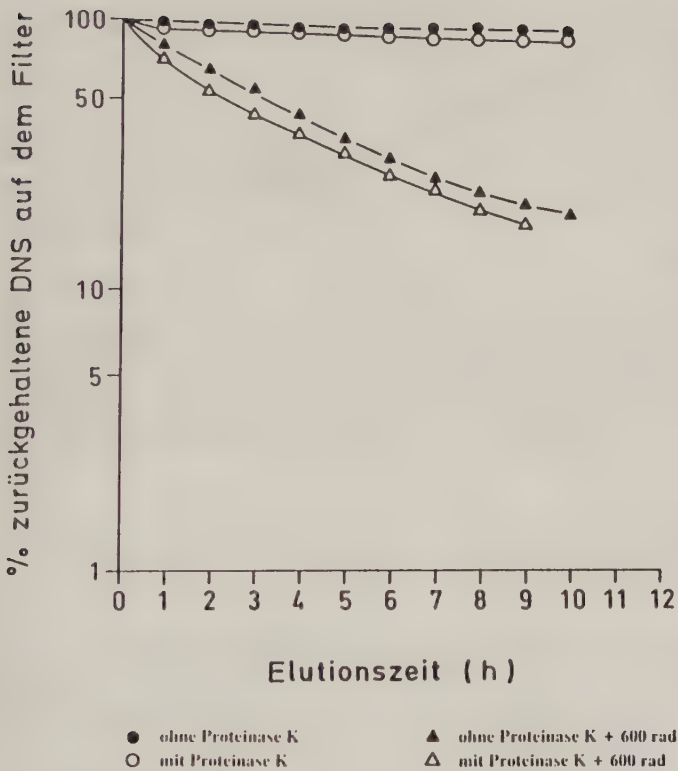


Abb. 23: Alkalische Elution von DNS aus mit 0,1 mM Diepoxymethan behandelten Zellkernen aus Mäuselebern; die auf den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarithmisch gegen die Elutionszeit aufgetragen (Tab. 11)

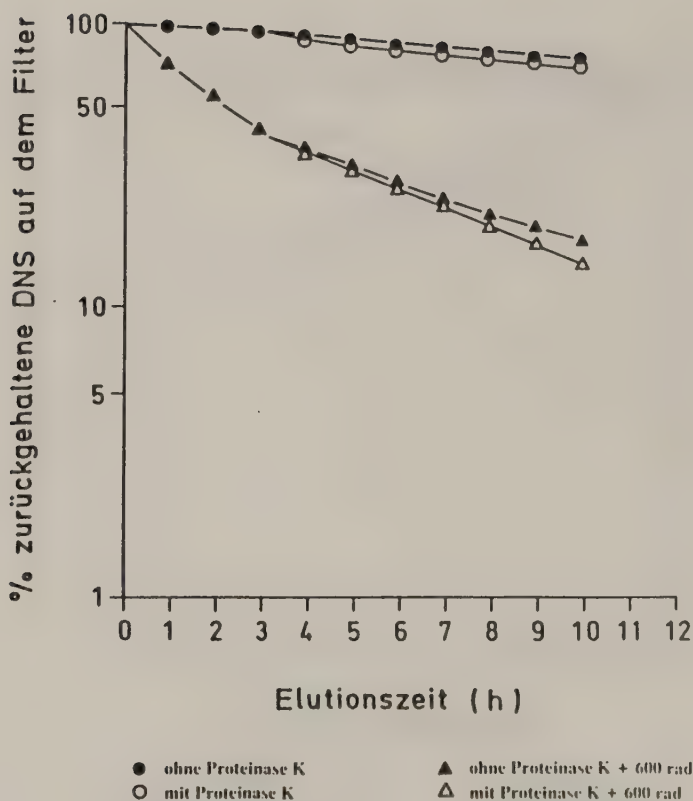


Abb. 24: Alkalische Elution von DNS aus mit 0,01 mM Diepoxy-
tan behandelten Zellkernen aus Mäuselebern; die auf
den Filtern verbliebene DNS (%) wurde halblogarith-
misch gegen die Elutionszeit aufgetragen (Tab. 10)

4.5 Schmelzkurvenverhalten von mit Diepoxybutan modifizierter DNS

Das Schmelzkurvenverhalten von käuflicher DNS aus Kalbsthymus nach einer Behandlung mit Diepoxybutan wurde ebenfalls untersucht. Abb. 25 zeigt, daß sich der T_m -Wert der so modifizierten DNS auch bei hohen Konzentrationen an Diepoxybutan nicht wesentlich verschiebt. Andererseits kam es nach Abkühlung der Proben zu einer deutlichen Extinktionsabnahme der modifizierten DNS bei höheren Konzentrationen an Diepoxybutan im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 1 zeigt A_T/A_{25} von mit verschiedenen Konzentrationen an Diepoxybutan behandelter DNS nach Abkühlung der Proben auf 25°C (siehe auch 3.2.4), wobei A_T die Extinktion (260 nm) der Proben bei der jeweils gemessenen Temperatur darstellt und A_{25} der Extinktion (260 nm) bei 25°C entspricht.

Konzentration an Diepoxybutan (mM)	A_T/A_{25} nach Abkühlung der Proben (25°C)
0,00	1,24
0,01	1,22
0,10	1,19
1,00	1,17

Tab. 1: Verhältnis von A_T (Extinktion bei der jeweiligen Temperatur) zu A_{25} (Extinktion bei 25°C) der mit Diepoxybutan behandelten DNS nach Abkühlung der Proben

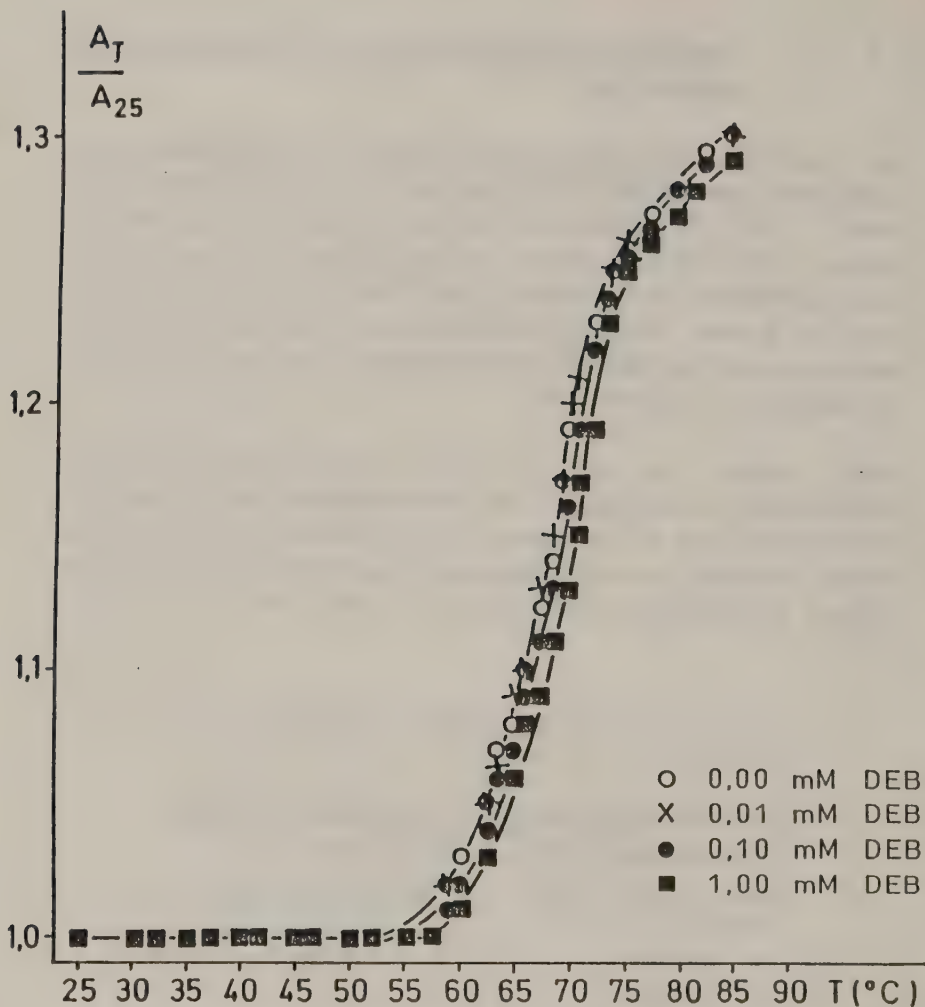


Abb. 25: Schmelzkurvenverhalten von mit Diepoxybutan (0,01 - 1,00 mM) behandelter DNS; A_T/A_{25} (Verhältnis der Extinktion bei der jeweiligen Temperatur zur Extinktion bei 25°C) wurde gegen Temperatur (°C) aufgetragen

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse diskutiert, die in der vorliegenden Arbeit über das Auftreten von durch die untersuchten Stoffe verursachten DNS-Schädigungen erhalten wurden.

5.1

Methylchlorid

Der erste Teil der Untersuchungen war dahingehend konzipiert worden, eine mögliche Erklärung für die (geschlechtsspezifische) Entstehung von Nierentumoren bei B6C3F1-Mäusen zu finden und der Frage nachzugehen, ob Formaldehyd als kritischer Metabolit von Methylchlorid mit den tumorerzeugenden Wirkungen von Methylchlorid in Nieren männlicher Mäuse in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Aus den bislang von Jäger et al. (1988) durchgeführten Untersuchungen zum Metabolismus von Methylchlorid an B6C3F1-Mäusen ergaben sich keine Hinweise auf eine Akkumulation von freiem Formaldehyd in dem jeweils untersuchten Gewebe (Leber, Nieren). Von den Autoren wurde infolge eines fehlenden Anstieges an freiem Formaldehyd im Gewebe selbst nach hoher Methylchloridbelastung (1000 ppm) dem intermediär gebildeten Formaldehyd keine wesentliche Bedeutung für die Entstehung von Tumoren beigemessen. Allerdings ist Formaldehyd in der Lage, sehr schnell mit Zellbestandteilen (Proteinen, Nukleinsäuren) zu reagieren. In dem von Jäger et al. angewendeten Meßverfahren konnte der chemisch gebundene Formaldehyd nicht bestimmt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen über die Auswirkungen einer Methylchloridbelastung sollten daher indirekt Aufschluß über die Möglichkeit einer Akkumulation von intermediär gebildetem Formaldehyd in den betreffenden Geweben geben. Ein Auftreten von für Formaldehyd charakteristischen DNS-Protein-Quervernetzungen würde für eine Akkumulation von Formaldehyd sprechen.

Eine gängige Methode für die Detektion gentoxischer Wirkungen von Fremdstoffen ist die sehr empfindliche (jedoch verhältnismäßig aufwendige) Technik der "alkalischen Filterelution". Für den Nachweis von DNS-Protein-Quervernetzungen wurde neben dieser Methode als eine mögliche Alternative die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation herangezogen (siehe 3.1.3.4). Als Gradientenmedium wurde Caesiumtrifluoracetat (CsTFA) aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Caesiumsalzen besonderen Eigenschaften als geeignet erachtet. So lassen sich beispielsweise durch CsTFA Proteine von Nukleinsäuren abtrennen. Den Untersuchungen lag folgende Überlegung zugrunde: Als kritischer Metabolit von Methylchlorid kommt Formaldehyd in Betracht, der in eukaryontischen Zellen DNS-Protein-Quervernetzungen verursachen kann. Proteine, welche nach einer Reaktion mit Formaldehyd kovalent an die DNS gebunden sind, lassen sich durch ein ionisches Reagenz wie CsTFA nicht abtrennen. Es wurde erwartet, daß eine durch Formaldehyd modifizierte DNS infolge der an sie kovalent gebundenen Proteine eine andere Dichte im CsTFA-Gradienten aufweist als proteinfreie DNS.

In Nierenzellkernen männlicher exponierter Mäuse (B6C3F1) gab es selbst nach einer hohen vorherigen Methylchloridbelastung (1000 ppm) der Tiere keine Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen im CsTFA-Gradienten. Das Fehlen dieser DNS-Läsionen schien zunächst mit den Befunden von Jäger et al. (1988) übereinzustimmen, die weder einen erhöhten Anstieg an intermediär gebildetem Formaldehyd noch DNS-Protein-Quervernetzungen in Nieren aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm) exponierten Mäusen feststellen konnten.

Durch Inkubationen in vitro mit Formaldehyd und Zellkernen konnte jedoch gezeigt werden, daß es erst ab einer verhältnismäßig hohen Formaldehydkonzentration (2 %) zu einem Dichteunterschied zwischen modifizierter und unveränderter DNS im CsTFA-Gradienten kam. Mit Hilfe der alkalischen Elution wiesen Grafstrom et al. (1983) in Bronchialzellen und Fibroblasten DNS-Protein-Quervernetzungen bereits ab einer Formaldehydkonzentration von 100 μ M nach. Diese Ergebnisse deuten

darauf hin, daß die Empfindlichkeit der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation unter den aufgeführten Bedingungen im Vergleich zur alkalischen Elution wesentlich geringer ist. Die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation ist wahrscheinlich für die Erfassung von DNS-Protein-Quervernetzungen in vivo nicht geeignet.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die nach Anwendung der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation erzielt wurden, gab es nach Einsatz der alkalischen Elution deutliche Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen in Nieren männlicher B6C3F1-Mäusen, wenn diese unmittelbar nach der Exposition gegenüber Methylchlorid getötet wurden. Weder das Elutionsverhalten von DNS aus Lebern von exponierten Mäusen beiderlei Geschlechts noch aus Nieren von gleichermaßen behandelten weiblichen Tieren deutete auf DNS-Protein-Quervernetzungen hin.

Unter einer hohen Methylchloridbelastung (1000 ppm) reicht offenbar die Stärke der Wirkung von intermediär gebildetem Formaldehyd aus, um die für Formaldehyd charakteristischen DNS-Protein-Quervernetzungen in Nieren männlicher Mäuse zu verursachen. Anscheinend kommt es in den Nieren männlicher Mäuse zu einer genügend hohen Konzentration an Formaldehyd, um noch nachweisbare Wirkungen auszulösen.

Eine Akkumulation von Formaldehyd im Gewebe könnte theoretisch unter Bedingungen hoher Methylchlorid-Exposition nach einem Absinken des Glutathionspiegels erfolgen. Da die cytosolische Formaldehyd-Dehydrogenase für die Verstoffwechselung von Formaldehyd als Kofaktor Glutathion benötigt, könnte nach einer hohen Methylchloridbelastung ein Mangel an verfügbarem Glutathion zu einer Inaktivierung des Enzyms und somit zu einer Akkumulation von Formaldehyd führen. Andererseits wird endogen gebildeter Formaldehyd im Cytosol neben der Formaldehyd-Dehydrogenase auch durch eine Reihe unspezifischer (Glutathion-unabhängiger) Aldehyd-Dehydrogenasen zu Ameisensäure oxidiert (Koivula und Koivusalo, 1975). Gegen eine

Akkumulation von Formaldehyd im Cytosol spricht auch das Fehlen eines Anstieges an freiem Formaldehyd in den Nieren und Lebern von Mäusen beiderlei Geschlechts (Jäger, 1988).

Eine Akkumulation von in Mikrosomen gebildetem Formaldehyd würde die in den Nieren männlicher Mäuse beobachteten und für Formaldehyd charakteristischen gentoxischen Wirkungen eher erklären. Interessanterweise ergaben frühere Gehaltsbestimmungen mikrosomaler Cytochrome P-450 in Nieren von Mäusen (B6C3F1) einen auffälligen Geschlechtsunterschied (Jäger, 1988). Bei männlichen B6C3F1-Mäusen lag der Gehalt an renalem Cytochrom P-450 zehnmal höher als bei weiblichen Tieren. Untersuchungen mit Mikrosomen aus Nieren von Mäusen (B6C3F1) beiderlei Geschlechts bestätigten, daß offenbar nur Nierenmikrosomen männlicher Mäuse in der Lage sind, Methylchlorid in größerer Menge oxidativ zu Formaldehyd zu dehalogenieren (Jäger, 1988). Wenn es unter einer hohen Methylchloridbelastung zu einem Absinken des Glutathion-Spiegels in den Nieren kommt, wird möglicherweise nur in männlichen Tieren der Metabolismus des inkorporierten Methylchlorids von der ursprünglich dominierenden Konjugation an Glutathion (via GSH-S-Transferasen) zugunsten einer oxidativen Dehalogenierung zu Formaldehyd an Cytochrom P-450 verschoben. Bei weiblichen Mäusen erfolgt dieser Reaktionsweg infolge eines Mangels an renalem Cytochrom P-450 anscheinend nicht (oder weniger). Angesichts der Tatsache, daß in Mikrosomen weder die Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase noch andere Aldehyd-Dehydrogenasen vorhanden sind, die Formaldehyd oxidieren können, (Koivulo und Koivusalo, 1975; Uotila und Koivusalo, 1974), wäre durch das Fehlen dieser Enzyme eine Akkumulation von Formaldehyd in den Nierenmikrosomen männlicher Mäuse möglich. Ulsamer et al. (1984) sind der Auffassung, daß Xenobiotika, die von Mikrosomen zu Formaldehyd metabolisiert werden, ein größeres karzinogenes Risiko darstellen könnten als Xenobiotika, die im Cytosol zu Formaldehyd abgebaut werden.

In Untersuchungen mit Lebermikrosomen aus Mäusen (B6C3F1) beiderlei Geschlechts stellte Jäger (1988) ebenfalls eine meßbare Umsetzung von Methylchlorid zu Formaldehyd fest. An-

dererseits gab es in den vorliegenden Studien weder in Lebern männlicher noch weiblicher Tiere nach hoher Methylchlorid-Exposition Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen, die auf eine Akkumulation von Formaldehyd in Lebermikrosomen hätten hindeuten können. In den Lebern von Mäusen (B6C3F1) liegt die spezifische Aktivität von GSH-S-Transferasen in Bezug auf den Methylchlorid-Umsatz deutlich höher als in den Nieren dieser Tiere (Jäger, 1988). Möglicherweise stellt in vivo die Konjugation von Methylchlorid an Glutathion den primären Reaktionsweg im Methylchlorid-Metabolismus in der Leber dar, während die oxidative Dehalogenierung von Methylchlorid zu Formaldehyd über Cytochrom P-450 wahrscheinlich (zunächst) keine wesentliche Rolle spielt. Da im Gegensatz zu anderen Organen die Leber in der Lage ist, auch größere Mengen an Aldehyden zu verstoffwechseln (Deitrich, 1966; Koivulo und Koivusalo, 1975), dürfte es selbst nach hoher Methylchloridbelastung nicht zu einer Akkumulation von Formaldehyd in der Leber kommen.

Wenn die Tötung der männlichen Mäuse 5 h nach der Exposition durchgeführt wurde, waren aus dem Elutionsverhalten der DNS aus Nierenzellkernen keine Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen zu erkennen. Der Elutionsverlauf der modifizierten DNS im Vergleich zur Kontrolle deutete lediglich auf Einzelstrangbrüche hin. Das Fehlen von DNS-Protein-Quervernetzungen ist wahrscheinlich auf eine innerhalb des Zeitraumes zwischen Beendigung der Exposition und Tötung der Tiere erfolgte DNS-Reparatur zurückzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse stehen mit Befunden von Ross und Shipley (1980) in Einklang, die zeigen konnten, daß mit 100 μ M Formaldehyd behandelte Zellen (L1210) in der Lage waren, innerhalb von 6 h den größten Teil der durch Formaldehyd verursachten DNS-Protein-Quervernetzungen wieder zu entfernen.

Die Reparatur von DNS-Protein-Quervernetzungen, die durch Fremdstoffe verursacht werden, vollzieht sich wahrscheinlich in mehreren Schritten. Eine Endonuklease schneidet den beschädigten Teil der DNS heraus. Nach dem Ersetzen der schadhafte Stelle durch (ein) weitere(s) Enzym(e) werden die durch die Exzisionsreparatur verursachten Lücken in der DNS

durch eine DNS-Ligase wieder geschlossen (Kohn, 1983). Meistens lassen sich durch Exzisionsreparatur ausgelöste Einzelstrangbrüche erst nach einer Hemmung der Reparatursynthese nachweisen, da unmittelbar nach der Entstehung von Einzelstrangbrüchen deren Schließung durch den Ligase-Schritt erfolgt. Grafstrom et al. (1983) konnten jedoch zeigen, daß in Bronchialzellen die Verknüpfung von Einzelstrangbrüchen, die künstlich durch Röntgenstrahlung erzeugt wurden, durch höhere Konzentrationen an Formaldehyd (100 μ M) inhibiert wird. Normalerweise sind diese Zellen in der Lage, solche Einzelstrangbrüche sehr effizient zu reparieren. Dies würde bedeuten, daß der "Ligase-Schritt" gegenüber Formaldehyd besonders empfindlich ist. Dieser Effekt von (intermediär gebildetem) Formaldehyd könnte die Anzeichen von Einzelstrangbrüchen in männlichen Mäusen 5 h nach einer Exposition gegenüber Methylchlorid erklären.

48 h nach Beendigung der Methylchloridexposition gab es in Nieren männlicher Mäuse weder Hinweise auf DNS-Protein-Quervernetzungen noch auf Einzelstrangbrüche. Diese Befunde deuteten darauf hin, daß innerhalb dieses Zeitraumes beide Arten von DNS-Läsionen (DNS-Protein-Quervernetzungen, Einzelstrangbrüche) repariert werden.

Die Frage stellte sich, wie sich eine mehrtägige Exposition von männlichen Mäusen gegenüber 1000 ppm Methylchlorid im Vergleich zu einer eintägigen Exposition hinsichtlich genotoxischer Effekte auswirkt. Auch nach einer viertägigen Exposition (6 h/Tag) wurden in Nieren männlicher Mäuse Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen beobachtet, obgleich diese nur andeutungsweise erkennbar waren. Der Befund deutet auf eine mögliche Adaptation der Tiere hin. Ob sich diese auf eine Stimulation der DNS-Reparatur oder auf eine beschleunigte Regenerierung des normalen Glutathion-Status als Folge einer mehrtägigen Methylchloridbelastung zurückführen läßt, ist ungeklärt.

5 Stunden nach Ablauf einer Methylchloridexposition gleicht das Elutionsverhalten von DNS aus Nierenzellkernen von männlichen mehrfach exponierten Mäusen dem Elutionsverhalten von

DNS aus nur einmalig exponierten Tieren. Auch hier waren Anzeichen von DNS-Einzelstrangbrüchen zu erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Jäger et al. (1988) überein, die ebenfalls 5 h nach Beendigung einer viertägigen Exposition in den Nieren männlicher Mäuse Hinweise auf Einzelstrangbrüche fanden. Allerdings wurde von den Autoren die Möglichkeit einer Reparatur von DNS-Protein-Quervernetzungen innerhalb des Zeitintervalles (5 h) zwischen Beendigung der Exposition und Tötung der Tiere nicht berücksichtigt. Das Auftreten von Einzelstrangbrüchen wurde von ihnen ausschließlich auf die Wirkung reaktiver Sauerstoffradikale zurückgeführt, die nach Absenken des intrazellulären Glutathionspiegels vermehrt auftreten könnten.

Die hier diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen den gentoxischen Wirkungen von intermediär gebildetem Formaldehyd nach hoher Methylchloridbelastung und den tumorerzeugenden Eigenschaften von Methylchlorid bestehen kann. Wahrscheinlich sind aber die durch Formaldehyd direkt ausgelösten DNS-Protein-Quervernetzungen nicht die eigentliche und einzige Ursache für die beobachteten Nierentumoren bei männlichen B6C3F1-Mäusen. Mit Hilfe der alkalischen Elution wurde gezeigt, daß DNS-Protein-Quervernetzungen verhältnismäßig schnell entfernt werden.

5 h nach Beendigung der Exposition ließen sich Anzeichen von Einzelstrangbrüchen in Nieren männlicher Mäuse erkennen. Anscheinend ist der Ligase-Schritt gegenüber Formaldehyd so empfindlich (vergl. Grafstrom et al., 1983), daß die Verknüpfung der Einzelstrangbrüche (durch Formaldehyd) gehemmt wird. Allerdings schienen die Mäuse in der Lage zu sein, nach einer gewissen Zeitdauer auch diese DNS-Läsionen zu reparieren: 48 h nach Beendigung der Methylchloridexposition wurden keine Anzeichen von Einzelstrangbrüchen mehr beobachtet. Eine vollständige Reparatur von Einzelstrangbrüchen ist aber vermutlich bei einer längerandauernden diskontinuierlichen Methylchloridbelastung nicht gewährleistet, wenn die Expositionen in zu kurzen Zeitabständen erfolgen. Auch bei der DNS-Reparatur selbst kann es gelegentlich zu Fehlern kommen, die an die Folgegenerationen weitergegeben und in diesen als

irreversible Schäden erhalten bleiben. Möglicherweise lassen sich die tumorerzeugenden Eigenschaften von Methylchlorid größtenteils auf die indirekten (durch DNS-Reparatur ausgelöst) Wirkungen von intermediär gebildetem Formaldehyd zurückführen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere Faktoren an der Entstehung von Nierentumoren in männlichen Mäusen beteiligt sein können. In der bereits öfter zitierten Karzinogenitätsstudie (Batelle Columbus Laboratories, 1981) wurden die männlichen Mäuse nicht in Einzelkäfigen gehalten. Durch die Dominanzkämpfe der Tiere traten bevorzugt Bißwunden an den Genitalien auf, die gehäuft zu Harnwegsinfektionen führten. Von Jäger und Mitarbeitern (1988) wurde die Hypothese aufgestellt, daß infolge einer permanenten Depletion des Antioxidans Glutathion nach hoher Methylchloridbelastung die entzündlichen Prozesse in den Nieren auf einen unzureichenden Oxidationsschutz trafen und eine Tumorgenese beschleunigten.

5.1.1 Übertragbarkeit der karzinogenen Wirkung von Methylchlorid auf den Menschen

Eine Diskussion um mögliche karzinogene Wirkungen von Methylchlorid beim Menschen wurde durch Befunde einer vom CIIT ("Chemical Industry Institute of Toxicology") durchgeführten Langzeitinhalationsstudie (Batelle Columbus Laboratories, 1981) an Mäusen (B6C3F1) hervorgerufen. Einige Mängel (z.B. Mehrfachhaltung der männlichen Tiere) in der Durchführung dieses Versuches schienen jedoch zunächst gegen eine generelle Übertragbarkeit der Tumorbefunde (bei männlichen Mäusen) auf den Menschen zu sprechen (vergl. Jäger, 1988).

Andererseits wurde übereinstimmend aus Studien zum Metabolismus von Methylchlorid an Ratten und Mäusen der Schluß gezogen, daß Formaldehyd intrazellulär als Zwischenprodukt auftritt (Kornbrust et al., 1982; Landry et al., 1983; Bus, 1982). Auch beim Menschen kommt Formaldehyd als Metabolit von Methylchlorid in Betracht (Van Doorn et al., 1980).

Die Reaktionsmöglichkeit von Formaldehyd mit Nukleinsäuren und Histonen ist aus Untersuchungen in vitro bekannt und konnte auch in vivo bestätigt werden (Heck et al., 1982).

In den vorliegenden Studien wurden nach hoher Methylchloridbelastung nur Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen in Nieren männlicher Mäuse beobachtet. Weder in Lebern von Mäusen beiderlei Geschlechts noch in Nieren weiblicher Tiere wurden ähnliche Effekte festgestellt. Das Auftreten bzw. Fehlen dieser Primärläsionen wurde auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Verstoffwechselung von Methylchlorid zu Formaldehyd zurückgeführt. Dabei bleibt offen, in welchem Ausmaße diese DNS-Protein-Quervernetzungen für die Entstehung der in männlichen Mäusen beobachteten Nierentumoren verantwortlich sind. In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß DNS-Protein-Quervernetzungen wieder verhältnismäßig schnell entfernt werden. Fehler in der Reparatur könnten jedoch die Bildung von Tumoren begünstigen.

Insgesamt ist bislang nicht klar, ob die Mechanismen, welche eine Entstehung von Nierentumoren bei Mäusen (B6C3F1) bewirken könnten, auch auf den Menschen übertragbar sind. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen, ob und unter welchen Umständen die Tumorbildung durch Methylchlorid auf Verhältnisse beim Menschen extrapoliert werden kann.

5.2 1,3-Butadien und Diepoxybutan

Eine Langzeitinhalations-Karzinogenitätsstudie mit 1,3-Butadien an Mäusen (B6C3F1) zeigte ein gehäuftes Auftreten von Tumoren (z.B. Hämangiosarkome des Herzens, Lungenkarzinome) ab einer Expositionskonzentration von 625 ppm auf (Huff et al., 1985). In einer Studie mit 1,3-Butadien an Ratten wurde ebenfalls eine - wenngleich schwache - tumorauslösende Wirkung von Butadien ab einer Expositionskonzentration von 1000 ppm festgestellt (Hazleton Laboratories Europe, 1981).

Ein Schritt im möglichen Mechanismus der karzinogenen Wirkung von 1,3-Butadien ist die Alkylierung der DNS durch reaktive Butadienmetabolite. Durch Inkubationen von Butadien mit Lebermikrosomen in vitro konnten Malvoisin und Roberfroid (1982) zeigen, daß Diepoxybutan sowie das Monoepoxid 1,2-Epoxybuten-3 durch mikrosomale Enzyme aus 1,3-Butadien entstehen. Kreiling (1987) und Jelitto (1988) stellten in DNS-Hydrolysaten aus Lebern von gegenüber Butadien exponierten Mäusen N-7-Guaninaddukte fest, die vermutlich auf die alkylierende Potenz von Diepoxybutan und/oder 1,2-Epoxybuten-3 zurückgeführt werden können.

Zusätzliche Hinweise, daß Diepoxybutan intermediär aus Butadien gebildet wird, erbrachten Untersuchungen von Vangala et al. (1987, 1989), die mit Hilfe der alkalischen Elution Anzeichen von DNS-DNS- und DNS-Protein-Quervernetzungen (sowie DNS-Einzelstrangbrüchen) in Lebern aus gegenüber Butadien exponierten B6C3F1-Mäusen ab Expositionskonzentrationen von 500 ppm feststellten. DNS-DNS - und DNS-Protein-Quervernetzungen sind charakteristisch für bifunktionell alkylierende Stoffe. In vitro Versuche mit Diepoxybutan und DNS bestätigten, daß eine Vernetzung der beiden DNS-Stränge durch eine bifunktionelle Alkylierung des Diepoxybutans an der N-7 Position von Guanin in "GpC" Sequenzen eines DNS-Moleküls erfolgen kann (Lawley und Brookes, 1967; Kohn et al., 1966).

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation der Nachweis von DNS-DNS-Quervernetzungen in Lebern aus gegenüber Butadien exponierten Tieren erbracht werden. Die Untersuchungen wurden an Phenol-extrahierter und über Hydroxylapatit gereinigter DNS aus mit hohen Expositionskonzentrationen (2000 ppm, 8 h/Tag, 7 Tage) behandelten Mäusen (B6C3F1) und Ratten (Sprague Dawley) durchgeführt. Falls Diepoxybutan endogen aus 1,3-Butadien gebildet wird, müßte sich nach einer entsprechenden Vorbehandlung (Alkali- oder Hitzedenaturierung) eine durch Diepoxybutan modifizierte DNS aufgrund ihrer Fähigkeit zu reassoziieren von einer chemisch-unveränderten DNS unterscheiden lassen. In diesem Verfahren ist die Reassoziationsfähigkeit der beiden

DNS-Stränge der kritische Schritt für die Erfassung von DNS-DNS-Quervernetzungen. Als Gradientenmedium wurde CsTFA verwendet. In einem CsTFA-Gradienten ist der Dichteunterschied (0,08) zwischen einer denaturierten einzelsträngigen DNS und einer nativen doppelsträngigen DNS ausreichend, um eine sichtbare Trennung der beiden Formen der DNS zu erreichen.

Selbst nach einer hohen Butadienbelastung (2000 ppm) konnten in keiner der untersuchten Tierspezies mittels der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation Anzeichen von DNS-DNS-Quervernetzungen festgestellt werden. Eine Ursache für das Fehlen von DNS-DNS-Quervernetzungen könnte eine Reparatur dieser DNS-Läsionen während der siebentägigen Exposition sein. So wäre z.B. eine DNS-Reparatur in den Zeitabständen zwischen den einzelnen Expositionen möglich. Auch Vangala und Mitarbeiter (1987) konnten mit der alkalischen Elutionstechnik DNS-DNS-Quervernetzungen nur nach einer einmaligen, nicht aber nach einer mehrtägigen Butadienexposition in Mäuselebern beobachten.

Mit Hilfe der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation ließen sich jedoch auch keine Anzeichen von DNS-DNS-Quervernetzungen in Lebern von Mäusen nachweisen, wenn diese einmalig gegenüber Butadien (2000 ppm, 24 h) exponiert und unmittelbar nach der Exposition getötet wurden.

Mit Hilfe der isopyknischen CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation ließen sich in Inkubationen mit Diepoxybutan und gereinigter DNS Anzeichen von DNS-DNS-Quervernetzungen bis zu einer Konzentration von 0,05 mM Diepoxybutan feststellen. Auch als Zellkerne mit Diepoxybutan behandelt und anschließend analysiert wurden, schien die DNS in der Lage zu sein, zu reassoziieren. Eine Verschiebung der DNS-Bande ab einer Konzentration von 0,50 mM Diepoxybutan deutete auf DNS-DNS-Quervernetzungen hin. In Zellkernen war im Gegensatz zu gereinigter DNS nach einer Behandlung dieser bifunktionell alkylierenden Verbindung nur eine einzige Bande erkennbar.

Vergleichbare Untersuchungen mit der alkalischen Elution ergaben, daß in Mäuseleberzellkernen DNS-DNS- und DNS-Protein-Quervernetzungen bis zu einer Konzentration von 0,01 mM Diepoxymethan nachgewiesen werden konnten. Die alkalische Elution scheint diesen Ergebnissen zufolge etwa fünfzigmal empfindlicher zu sein als die isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation. Die geringere Empfindlichkeit der Zentrifugationstechnik im Vergleich zur alkalischen Elution könnte das Fehlen nachweisbarer DNS-DNS-Quervernetzungen in Lebern aus gegenüber Butadien exponierten Tieren ebenfalls erklären.

Von Grunicke et al. (1973) wird diskutiert, daß bifunktionell alkylierende Agentien die übliche Extraktion von DNS mit Phenol stark beeinträchtigen können. Falls es unter einer hohen Butadienbelastung zu einer endogenen Bildung von Diepoxymethan kommt, werden unter Umständen bei einer Behandlung von Zellen mit Phenol neben Proteinen auch DNS-Moleküle extrahiert, die durch eine bifunktionelle Alkylierung an Proteine vernetzt wurden. DNS, bei der nach Reaktion mit Diepoxymethan eine Verknüpfung der beiden Stränge erfolgt war, könnte bei einer Phenolbehandlung ebenfalls mitextrahiert werden. Möglicherweise ist für den Nachweis von DNS-DNS-Quervernetzungen, die in vivo gebildet werden, eine Phenolextraktion von DNS aus Zellen nicht geeignet.

Mit der alkalischen Elution ließen sich in Mäusezellkernen nach einer Behandlung mit Diepoxymethan Anzeichen von DNS-DNS und DNS-Protein-Quervernetzungen feststellen. Ähnliche Effekte wurden auch in Lebern von gegenüber Butadien exponierten Mäusen (B6C3F1) gesehen (Vangala et al., 1987, 1989). Die von Vangala et al. nachgewiesenen Einzelstrangbrüche in Lebern von gegenüber Butadien exponierten Tieren wurden aber in mit Diepoxymethan behandelten Zellkernen nicht beobachtet. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Einzelstrangbrüche vorwiegend durch DNS-Reparatur, nicht aber durch direkte chemische Reaktionen der Butadienmetabolite (1,2-Epoxybuten-3 oder Diepoxymethan) ausgelöst werden.

Bei dem Schmelzkurvenverhalten einer mit Diepoxybutan behandelten DNS kam es nicht zu einer eindeutigen Verschiebung des T_m -Wertes. Nach Abkühlung der Proben wurde aber eine Extinktionsabnahme der modifizierten DNS im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 0,01 mM Diepoxybutan beobachtet. Offensichtlich ist die modifizierte DNS in der Lage, zu reassoziieren, was auf DNS-DNS-Quervernetzungen schließen läßt. Diese Methode ist den Untersuchungen zufolge etwa fünfmal empfindlicher als die isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diene dem Nachweis von DNS-Schäden, die eventuell durch metabolische Folgeprodukte (Formaldehyd, Diepoxybutan) karzinogener Verbindungen (Methylchlorid bzw. 1,3-Butadien) ausgelöst werden.

Zur Erfassung der Primärläsionen wurden vorwiegend die alkalische Elution und die isopyknische CsTFA-Gleichgewichtszentrifugation herangezogen.

Zwar ließen sich mit Hilfe der isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation in Inkubationen in vitro von DNS mit Formaldehyd bzw. Diepoxybutan bei verhältnismäßig hohen Testsubstanzkonzentrationen die für diese Fremdstoffe charakteristischen DNS-Schädigungen (DNS-Protein-Quervernetzungen, DNS-DNS-Quervernetzungen) nachweisen, doch konnten nach Exposition von Versuchstieren gegenüber Methylchlorid bzw. 1,3-Butadien vergleichbare gentoxische Effekte nicht festgestellt werden.

Mit der Methode der "alkalischen Elution" wurden nach einer hohen Methylchloridbelastung (1000 ppm) in Nieren männlicher Mäuse, die unmittelbar nach Beendigung der Exposition getötet wurden, Anzeichen von für Formaldehyd charakteristischen DNS-Protein-Quervernetzungen beobachtet. Weder in Lebern

männlicher noch in Lebern/Nieren weiblicher Tiere, die ebenfalls gegenüber Methylchlorid exponiert wurden, gab es Hinweise auf vergleichbare gentoxische Effekte.

5 h nach der Exposition verschwanden jedoch auch in den Nieren männlicher Mäuse die Anzeichen von DNS-Protein-Quervernetzungen. Das Fehlen dieser Läsionen wurde auf eine DNS-Reparatur zurückgeführt. Es gab lediglich Hinweise auf Einzelstrangbrüche. Diese entstehen möglicherweise durch das Herausschneiden der durch Formaldehyd verursachten DNS-Schädigungen (Exzisionsreparatur). Die Mäuse schienen in der Lage zu sein, nach einer gewissen Zeit auch die Einzelstrangbrüche zu entfernen: 48 h nach der Exposition wurden diese DNS-Läsionen nicht mehr festgestellt.

Auch nach einer mehrtägigen Methylchloridbelastung (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) gab es in den Nieren männlicher Mäuse Hinweise auf DNS-Protein-Quervernetzungen, die dann innerhalb von 5 h nach der letzten Exposition entfernt wurden.

Mit der "alkalischen Elution" ließen sich in mit Diepoxymutan behandelten Zellkernen Anzeichen von DNS-DNS- und DNS-Protein-Quervernetzungen feststellen. Ähnliche Primärläsionen wurden auch in Leberzellkernen aus gegenüber Butadien exponierten Mäusen beobachtet. Die in diesen Tieren nachgewiesenen Einzelstrangbrüche wurden in mit Diepoxymutan behandelten Zellkernen nicht gemessen. Dieser Befund läßt die Vermutung zu, daß die Einzelstrangbrüche durch DNS-Reparatur, nicht aber durch direkte chemische Wirkungen der Butadienmetabolite ausgelöst werden könnten.

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) aus Dreifachbestimmungen zusammengefaßt, die für die einzelnen Elutionskurven (Alkalische Elution) verwendet wurden.

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	96,1 $\pm$ 1,5	96,5 $\pm$ 2,2	95,3 $\pm$ 0,3	94,5 $\pm$ 1,5
2	93,0 $\pm$ 2,0	90,8 $\pm$ 2,1	90,6 $\pm$ 0,9	86,9 $\pm$ 2,4
3	90,5 $\pm$ 1,8	85,3 $\pm$ 2,8	85,9 $\pm$ 1,5	81,4 $\pm$ 3,1
4	87,8 $\pm$ 2,8	83,3 $\pm$ 1,9	82,1 $\pm$ 1,0	77,2 $\pm$ 4,3
5	86,2 $\pm$ 2,8	80,3 $\pm$ 1,8	79,3 $\pm$ 2,4	76,8 $\pm$ 3,4
6	84,4 $\pm$ 1,7	79,0 $\pm$ 0,7	78,4 $\pm$ 1,9	74,0 $\pm$ 3,1
7	82,7 $\pm$ 1,9	77,2 $\pm$ 2,1	76,5 $\pm$ 2,0	72,0 $\pm$ 3,0
8	81,8 $\pm$ 2,4	75,0 $\pm$ 1,5	74,6 $\pm$ 1,7	70,0 $\pm$ 2,8
9	80,9 $\pm$ 2,7	70,0 $\pm$ 2,3	73,7 $\pm$ 1,7	68,6 $\pm$ 1,7
10	80,0 $\pm$ 3,0	69,0 $\pm$ 1,9	72,8 $\pm$ 1,0	67,2 $\pm$ 2,2
11	78,3 $\pm$ 3,1	68,0 $\pm$ 2,0	70,9 $\pm$ 0,9	63,0 $\pm$ 2,0

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	83,2 $\pm$ 0,5	65,8 $\pm$ 4,8	77,1 $\pm$ 1,9	74,4 $\pm$ 3,7
2	61,0 $\pm$ 2,9	47,9 $\pm$ 2,4	62,0 $\pm$ 2,3	50,0 $\pm$ 5,0
3	46,0 $\pm$ 2,7	30,0 $\pm$ 3,9	48,1 $\pm$ 1,4	38,2 $\pm$ 3,4
4	36,4 $\pm$ 2,5	23,9 $\pm$ 2,5	36,0 $\pm$ 1,6	31,5 $\pm$ 2,9
5	30,4 $\pm$ 2,5	20,8 $\pm$ 2,5	31,0 $\pm$ 1,9	27,3 $\pm$ 2,7
6	26,8 $\pm$ 2,4	18,2 $\pm$ 2,4	25,9 $\pm$ 3,0	23,9 $\pm$ 2,9
7	24,4 $\pm$ 1,9	16,7 $\pm$ 2,6	24,9 $\pm$ 2,4	21,0 $\pm$ 3,1
8	23,9 $\pm$ 2,6	15,2 $\pm$ 2,3	21,9 $\pm$ 2,6	18,1 $\pm$ 3,0
9	21,5 $\pm$ 2,0	13,7 $\pm$ 2,1	20,8 $\pm$ 2,0	16,4 $\pm$ 3,4
10	20,0 $\pm$ 2,0	12,7 $\pm$ 2,0	19,6 $\pm$ 2,1	15,9 $\pm$ 3,5
11		10,1 $\pm$ 2,1	17,8 $\pm$ 1,9	

Tab. 2: Alkalische Elution von Leber-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition (vergl. Abb. 10)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	86,1 $\pm$ 0,7	87,8 $\pm$ 2,0	88,8 $\pm$ 0,9	90,7 $\pm$ 2,3
2	77,6 $\pm$ 1,0	76,1 $\pm$ 1,4	79,6 $\pm$ 0,6	81,3 $\pm$ 1,9
3	69,6 $\pm$ 2,4	67,7 $\pm$ 0,5	73,3 $\pm$ 1,3	74,0 $\pm$ 1,4
4	64,1 $\pm$ 3,1	61,6 $\pm$ 1,4	68,8 $\pm$ 0,8	65,4 $\pm$ 1,5
5	60,1 $\pm$ 3,9	56,4 $\pm$ 1,8	65,2 $\pm$ 1,0	64,0 $\pm$ 1,7
6	57,1 $\pm$ 4,3	52,8 $\pm$ 2,8	62,7 $\pm$ 1,2	61,0 $\pm$ 1,5
7	54,8 $\pm$ 4,6	50,1 $\pm$ 3,7	61,7 $\pm$ 1,0	58,9 $\pm$ 2,8
8	52,7 $\pm$ 4,7	48,3 $\pm$ 4,3		55,4 $\pm$ 1,7
9	51,3 $\pm$ 5,0	48,2 $\pm$ 4,3		54,0 $\pm$ 1,7
10	51,2 $\pm$ 4,8			

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	59,9 $\pm$ 4,8	54,7 $\pm$ 2,1	62,3 $\pm$ 2,3	52,5 $\pm$ 2,1
2	38,9 $\pm$ 3,9	31,7 $\pm$ 2,2	44,0 $\pm$ 2,2	32,7 $\pm$ 2,5
3	24,8 $\pm$ 2,7	21,2 $\pm$ 2,4	34,3 $\pm$ 2,1	22,1 $\pm$ 2,9
4	18,7 $\pm$ 2,3	16,0 $\pm$ 1,8	28,4 $\pm$ 1,9	17,2 $\pm$ 3,4
5	15,8 $\pm$ 2,4	13,4 $\pm$ 1,6	25,2 $\pm$ 2,0	14,2 $\pm$ 2,7
6	14,4 $\pm$ 2,3	12,0 $\pm$ 1,9	23,3 $\pm$ 1,9	12,7 $\pm$ 2,8
7	13,5 $\pm$ 2,1	11,2 $\pm$ 2,0	22,0 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 2,6
8	12,9 $\pm$ 2,0	10,8 $\pm$ 2,2	21,2 $\pm$ 1,9	11,1 $\pm$ 2,6
9	12,5 $\pm$ 2,4	10,2 $\pm$ 2,8	20,4 $\pm$ 2,0	10,2 $\pm$ 2,5
10	12,4 $\pm$ 2,5		20,0 $\pm$ 2,0	

Tab. 3: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition (vergl. Abb. 11)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	96,1 $\pm$ 2,8	91,9 $\pm$ 0,5	93,9 $\pm$ 2,5	92,1 $\pm$ 0,4
2	93,2 $\pm$ 1,9	88,0 $\pm$ 0,6	92,0 $\pm$ 2,8	87,8 $\pm$ 1,5
3	90,0 $\pm$ 1,7	84,0 $\pm$ 1,3	87,9 $\pm$ 1,9	83,8 $\pm$ 2,6
4	87,2 $\pm$ 1,7	77,1 $\pm$ 1,2	85,1 $\pm$ 2,1	79,9 $\pm$ 1,7
5	86,1 $\pm$ 1,9	75,2 $\pm$ 0,9	83,4 $\pm$ 2,0	77,8 $\pm$ 2,1
6	84,9 $\pm$ 2,0	73,4 $\pm$ 0,7	81,0 $\pm$ 3,4	76,8 $\pm$ 1,7
7	83,2 $\pm$ 1,4	71,1 $\pm$ 0,9	78,2 $\pm$ 2,4	74,9 $\pm$ 2,0
8	81,9 $\pm$ 2,1	70,1 $\pm$ 1,0	76,9 $\pm$ 2,1	72,7 $\pm$ 2,1
9	80,5 $\pm$ 2,0			

t	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	50,0 $\pm$ 0,4	50,0 $\pm$ 1,4	60,1 $\pm$ 0,2	49,8 $\pm$ 0,3
2	30,1 $\pm$ 0,6	30,0 $\pm$ 1,3	38,5 $\pm$ 0,3	30,1 $\pm$ 0,8
3	22,9 $\pm$ 0,7	23,2 $\pm$ 0,4	28,0 $\pm$ 0,6	23,0 $\pm$ 1,0
4	19,0 $\pm$ 0,9	19,5 $\pm$ 0,3	24,6 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 1,4
5	16,5 $\pm$ 0,3	16,2 $\pm$ 0,7	21,5 $\pm$ 0,4	16,0 $\pm$ 0,7
6	15,0 $\pm$ 0,5	14,0 $\pm$ 0,3	19,0 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 2,0
7	13,9 $\pm$ 0,4	12,9 $\pm$ 0,5	18,3 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 1,7
8	13,0 $\pm$ 0,4	11,9 $\pm$ 0,7	17,8 $\pm$ 0,6	11,2 $\pm$ 1,7
9	12,9 $\pm$ 0,5	10,9 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 0,7	

Tab. 4: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition (vergl. Abb. 12)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	97,2 $\pm$ 1,9	98,0 $\pm$ 0,5	93,3 $\pm$ 0,7	87,2 $\pm$ 0,5
2	96,0 $\pm$ 1,5	95,0 $\pm$ 0,6	90,0 $\pm$ 0,3	83,5 $\pm$ 0,7
3	94,0 $\pm$ 0,7	94,3 $\pm$ 0,5	85,2 $\pm$ 0,5	79,9 $\pm$ 0,2
4	91,0 $\pm$ 0,6	89,9 $\pm$ 0,7	80,1 $\pm$ 0,4	76,1 $\pm$ 0,3
5	90,0 $\pm$ 1,5	85,0 $\pm$ 1,1	78,3 $\pm$ 0,5	73,2 $\pm$ 1,1
6	88,8 $\pm$ 2,3	81,2 $\pm$ 0,9	75,4 $\pm$ 0,7	70,1 $\pm$ 0,9
7	86,3 $\pm$ 2,4	79,8 $\pm$ 0,7	73,2 $\pm$ 0,3	67,5 $\pm$ 0,4
8	85,0 $\pm$ 1,9	78,0 $\pm$ 0,5	71,0 $\pm$ 0,7	63,8 $\pm$ 0,3
9			69,9 $\pm$ 0,9	

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	69,9 $\pm$ 1,2	70,0 $\pm$ 1,0	70,0 $\pm$ 0,9	60,0 $\pm$ 0,7
2	45,1 $\pm$ 0,8	42,0 $\pm$ 2,1	41,8 $\pm$ 1,4	38,2 $\pm$ 0,4
3	35,8 $\pm$ 0,4	33,0 $\pm$ 2,5	33,6 $\pm$ 1,3	30,0 $\pm$ 0,5
4	28,1 $\pm$ 0,5	26,5 $\pm$ 2,3	26,0 $\pm$ 2,9	24,1 $\pm$ 0,6
5	22,4 $\pm$ 0,7	21,4 $\pm$ 2,5	21,2 $\pm$ 2,3	20,0 $\pm$ 1,1
6	20,0 $\pm$ 0,9	18,1 $\pm$ 2,7	18,0 $\pm$ 1,9	17,1 $\pm$ 1,3
7	17,6 $\pm$ 0,5	16,0 $\pm$ 2,4	15,1 $\pm$ 1,8	14,0 $\pm$ 1,2
8	15,9 $\pm$ 0,4	13,9 $\pm$ 2,6	12,9 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 1,0
9	14,8 $\pm$ 0,3	12,4 $\pm$ 1,9	11,9 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 1,0

Tab. 5: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 5 h nach der Exposition (vergl. Abb. 13)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	97,1 $\pm$ 0,3	91,2 $\pm$ 2,6	95,0 $\pm$ 2,0	95,1 $\pm$ 1,9
2	95,0 $\pm$ 1,4	87,3 $\pm$ 0,9	91,2 $\pm$ 2,1	91,3 $\pm$ 2,3
3	92,4 $\pm$ 1,3	84,9 $\pm$ 0,8	87,3 $\pm$ 2,6	87,0 $\pm$ 2,5
4	90,1 $\pm$ 1,2	80,0 $\pm$ 0,7	85,1 $\pm$ 2,5	82,1 $\pm$ 2,1
5	89,7 $\pm$ 1,1	77,3 $\pm$ 0,6	84,0 $\pm$ 2,1	79,8 $\pm$ 1,7
6	87,6 $\pm$ 1,5	76,0 $\pm$ 0,7	83,1 $\pm$ 2,7	77,5 $\pm$ 1,9
7	86,1 $\pm$ 1,3	75,0 $\pm$ 0,8	82,4 $\pm$ 2,3	76,0 $\pm$ 1,8
8	84,9 $\pm$ 1,3	72,5 $\pm$ 1,3	81,5 $\pm$ 2,4	75,5 $\pm$ 2,1
9	84,5 $\pm$ 1,1	70,0 $\pm$ 1,2	80,0 $\pm$ 2,1	74,0 $\pm$ 2,5
10	84,0 $\pm$ 0,9	69,1 $\pm$ 0,9	79,0 $\pm$ 2,1	
11	83,0 $\pm$ 1,1		78,0 $\pm$ 2,2	

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	54,5 $\pm$ 0,9	52,0 $\pm$ 2,9	52,1 $\pm$ 2,7	47,2 $\pm$ 0,5
2	31,0 $\pm$ 0,8	28,2 $\pm$ 2,3	28,4 $\pm$ 2,8	25,8 $\pm$ 0,7
3	23,0 $\pm$ 1,1	19,1 $\pm$ 2,5	21,1 $\pm$ 2,3	17,9 $\pm$ 0,6
4	19,2 $\pm$ 1,7	16,2 $\pm$ 2,7	17,3 $\pm$ 2,4	15,0 $\pm$ 0,5
5	17,0 $\pm$ 1,0	13,4 $\pm$ 2,8	15,1 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 0,9
6	15,0 $\pm$ 1,1	11,8 $\pm$ 2,7	13,1 $\pm$ 2,7	10,8 $\pm$ 0,7
7	13,0 $\pm$ 1,5	10,1 $\pm$ 2,3	12,1 $\pm$ 2,8	
8	12,0 $\pm$ 1,1	9,1 $\pm$ 2,3	10,6 $\pm$ 1,9	
9		8,5 $\pm$ 2,4		

Tab. 6: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 8 h) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 48 h nach der Exposition (vergl. Abb. 14)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	99,1 $\pm$ 0,6	97,5 $\pm$ 0,7	99,0 $\pm$ 0,3	97,4 $\pm$ 0,9
2	98,2 $\pm$ 0,7	95,0 $\pm$ 0,9	97,8 $\pm$ 0,9	94,5 $\pm$ 1,9
3	96,0 $\pm$ 0,3	93,6 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 1,3	92,9 $\pm$ 1,4
4	94,8 $\pm$ 0,8	91,4 $\pm$ 0,4	94,6 $\pm$ 0,6	89,9 $\pm$ 1,5
5	92,1 $\pm$ 1,2	87,2 $\pm$ 0,7	93,0 $\pm$ 0,5	86,5 $\pm$ 1,9
6	89,2 $\pm$ 1,3	83,4 $\pm$ 0,5	89,1 $\pm$ 1,2	84,2 $\pm$ 2,0
7	87,3 $\pm$ 1,6	81,0 $\pm$ 0,9	87,4 $\pm$ 1,5	81,2 $\pm$ 2,1
8	83,1 $\pm$ 1,9	77,5 $\pm$ 1,9	84,0 $\pm$ 1,4	78,6 $\pm$ 2,2
9	82,3 $\pm$ 2,0	76,4 $\pm$ 0,7	82,3 $\pm$ 1,3	74,3 $\pm$ 2,4
10	79,9 $\pm$ 2,3	72,3 $\pm$ 0,9	77,6 $\pm$ 2,0	68,8 $\pm$ 0,9

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	64,0 $\pm$ 0,1	65,1 $\pm$ 0,4	70,1 $\pm$ 0,5	65,2 $\pm$ 0,5
2	47,3 $\pm$ 0,4	48,2 $\pm$ 0,5	52,3 $\pm$ 0,3	48,0 $\pm$ 0,6
3	35,9 $\pm$ 0,5	34,3 $\pm$ 0,6	40,3 $\pm$ 0,4	34,2 $\pm$ 0,4
4	27,8 $\pm$ 0,4	25,8 $\pm$ 0,9	30,3 $\pm$ 0,1	25,4 $\pm$ 0,7
5	22,0 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,5	24,6 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,5
6	18,5 $\pm$ 0,5	16,2 $\pm$ 0,6	20,0 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 0,3
7	16,7 $\pm$ 0,2	14,7 $\pm$ 0,7	19,0 $\pm$ 0,2	14,0 $\pm$ 0,3
8	14,9 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,6	17,5 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 0,3
9	13,9 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 0,9	16,0 $\pm$ 0,3	10,8 $\pm$ 0,4
10	12,8 $\pm$ 0,1	11,2 $\pm$ 0,9	15,2 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,2

Tab. 7: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Exposition (vergl. Abb. 15)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	Kontrolle	Kontrolle + Proteinase K	Exponierte	Exponierte + Proteinase K
1	98,8 $\pm$ 0,1	97,4 $\pm$ 0,5	97,3 $\pm$ 0,4	85,4 $\pm$ 0,6
2	96,2 $\pm$ 0,5	95,0 $\pm$ 0,9	92,3 $\pm$ 0,3	81,2 $\pm$ 1,1
3	95,0 $\pm$ 0,9	94,2 $\pm$ 0,7	90,2 $\pm$ 0,5	77,7 $\pm$ 0,9
4	93,2 $\pm$ 1,1	93,3 $\pm$ 0,5	87,8 $\pm$ 0,6	75,2 $\pm$ 0,7
5	92,1 $\pm$ 0,5	91,0 $\pm$ 1,0	84,2 $\pm$ 0,5	73,2 $\pm$ 0,8
6	90,4 $\pm$ 1,2	89,4 $\pm$ 0,5	81,5 $\pm$ 0,4	70,0 $\pm$ 0,7
7	89,2 $\pm$ 0,9	86,3 $\pm$ 0,4	79,8 $\pm$ 0,7	67,8 $\pm$ 0,5
8	88,1 $\pm$ 0,4	85,1 $\pm$ 0,5	76,7 $\pm$ 0,5	66,2 $\pm$ 0,6
9	86,3 $\pm$ 1,0	83,7 $\pm$ 0,7	75,0 $\pm$ 0,4	64,8 $\pm$ 0,5
10	85,0 $\pm$ 1,0	81,5 $\pm$ 1,0	72,4 $\pm$ 0,5	62,2 $\pm$ 0,9

t (h)	Kontrolle + 600 rad	Kontrolle + Proteinase K + 600 rad	Exponierte + 600 rad	Exponierte + Proteinase K + 600 rad
1	63,9 $\pm$ 0,9	64,0 $\pm$ 1,0	63,7 $\pm$ 1,1	56,2 $\pm$ 0,9
2	40,8 $\pm$ 0,7	37,3 $\pm$ 1,4	36,8 $\pm$ 1,5	32,8 $\pm$ 1,4
3	28,7 $\pm$ 1,7	25,0 $\pm$ 1,9	24,9 $\pm$ 2,3	22,0 $\pm$ 1,3
4	25,0 $\pm$ 0,9	22,1 $\pm$ 2,7	22,1 $\pm$ 1,9	18,9 $\pm$ 1,3
5	21,1 $\pm$ 0,8	19,2 $\pm$ 2,8	17,9 $\pm$ 1,8	16,3 $\pm$ 1,5
6	18,6 $\pm$ 0,9	17,0 $\pm$ 3,0	15,4 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 1,4
7	17,3 $\pm$ 1,0	15,0 $\pm$ 3,1	13,0 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 1,4
8	15,1 $\pm$ 1,1	13,0 $\pm$ 2,8	11,5 $\pm$ 1,4	10,6 $\pm$ 1,5
9	14,0 $\pm$ 0,3	12,0 $\pm$ 1,9	10,0 $\pm$ 1,5	9,1 $\pm$ 1,2
10	12,6 $\pm$ 0,2		8,6 $\pm$ 1,2	
11	11,3 $\pm$ 0,4			

Tab. 8: Alkalische Elution von Nieren-DNS aus gegenüber Methylchlorid (1000 ppm, 6 h/Tag, 4 Tage) exponierten männlichen Mäusen; die Tötung der Tiere erfolgte 5 h nach der Exposition

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	0,0 mM DEB	0,0 mM DEB + Proteinase K	0,0 mM DEB + 600 rad	0,0 mM DEB + Proteinase K + 600 rad
1	95,9 $\pm$ 0,9	95,8 $\pm$ 0,5	72,8 $\pm$ 1,3	72,7 $\pm$ 0,3
2	94,2 $\pm$ 0,6	94,2 $\pm$ 0,6	55,0 $\pm$ 0,8	51,1 $\pm$ 0,4
3	90,0 $\pm$ 0,9	90,1 $\pm$ 0,4	49,0 $\pm$ 1,0	39,2 $\pm$ 0,3
4	87,9 $\pm$ 0,2	88,0 $\pm$ 0,7	35,0 $\pm$ 0,1	30,7 $\pm$ 0,6
5	84,9 $\pm$ 1,5	82,9 $\pm$ 0,4	28,1 $\pm$ 1,0	26,0 $\pm$ 0,4
6	82,2 $\pm$ 0,6	79,1 $\pm$ 0,5	24,2 $\pm$ 0,1	21,9 $\pm$ 0,7
7	80,0 $\pm$ 0,3	75,2 $\pm$ 0,2	20,1 $\pm$ 0,3	18,9 $\pm$ 0,7
8	78,1 $\pm$ 0,3	72,9 $\pm$ 1,3	17,1 $\pm$ 0,4	16,1 $\pm$ 0,3
9	75,1 $\pm$ 0,3	70,8 $\pm$ 0,5	14,0 $\pm$ 0,3	13,2 $\pm$ 0,3
10	73,4 $\pm$ 1,2	68,1 $\pm$ 0,3	13,2 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 0,4

Tab. 9: Alkalische Elution von DNS aus unbehandelten Mäuseleberzellkernen (vergl. Abb. 22)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	0,01 mM DEB	0,01 mM DEB + Proteinase K	0,01 mM DEB + 600 rad	0,01 mM DEB + Proteinase K + 600 rad
1	95,9 $\pm$ 1,1	95,8 $\pm$ 0,5	70,0 $\pm$ 1,0	70,1 $\pm$ 0,8
2	94,2 $\pm$ 0,3	94,5 $\pm$ 1,3	53,9 $\pm$ 0,4	54,1 $\pm$ 0,2
3	92,3 $\pm$ 0,9	92,3 $\pm$ 0,9	41,2 $\pm$ 0,6	40,9 $\pm$ 0,5
4	90,1 $\pm$ 0,5	85,0 $\pm$ 1,2	34,9 $\pm$ 1,7	32,5 $\pm$ 0,9
5	85,0 $\pm$ 0,8	80,0 $\pm$ 1,2	30,5 $\pm$ 0,9	29,0 $\pm$ 0,8
6	82,1 $\pm$ 0,3	76,9 $\pm$ 0,6	26,1 $\pm$ 0,3	24,9 $\pm$ 0,3
7	78,2 $\pm$ 1,0	74,3 $\pm$ 0,4	23,0 $\pm$ 1,0	21,5 $\pm$ 0,8
8	74,8 $\pm$ 0,9	70,5 $\pm$ 0,6	20,0 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,0
9	73,2 $\pm$ 0,3	67,3 $\pm$ 0,3	18,2 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 1,1
10	71,5 $\pm$ 0,5	66,1 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,7	13,9 $\pm$ 0,1

Tab. 10: Alkalische Elution von DNS aus mit 0,01 mM Diepoxybutan (DEB) behandelten Mäuseleberzellkernen (Abb. 24)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	0,1 mM DEB	0,1 mM DEB + Proteinase K	0,1 mM DEB + 600 rad	0,1 mM DEB + Proteinase K + 600 rad
1	97,1 $\pm$ 0,2	92,1 $\pm$ 1,0	79,1 $\pm$ 1,4	70,1 $\pm$ 1,5
2	95,1 $\pm$ 0,1	90,8 $\pm$ 0,4	64,9 $\pm$ 0,5	54,2 $\pm$ 0,9
3	94,8 $\pm$ 0,2	89,1 $\pm$ 0,4	53,2 $\pm$ 1,0	42,9 $\pm$ 1,7
4	92,0 $\pm$ 0,1	86,2 $\pm$ 0,7	43,0 $\pm$ 0,4	36,3 $\pm$ 1,0
5	91,0 $\pm$ 0,9	85,0 $\pm$ 0,2	35,2 $\pm$ 0,9	31,4 $\pm$ 1,0
6	90,0 $\pm$ 0,1	83,1 $\pm$ 0,4	29,8 $\pm$ 0,8	25,1 $\pm$ 0,5
7	89,8 $\pm$ 0,1	82,5 $\pm$ 0,4	25,3 $\pm$ 0,6	22,6 $\pm$ 1,1
8	89,0 $\pm$ 0,2	81,0 $\pm$ 0,6	22,0 $\pm$ 0,5	19,2 $\pm$ 1,0
9	88,7 $\pm$ 0,1	80,0 $\pm$ 0,9	20,1 $\pm$ 0,6	16,9 $\pm$ 1,0
10	88,1 $\pm$ 0,1	80,0 $\pm$ 0,9	18,4 $\pm$ 0,4	

Tab. 11: Alkalische Elution von DNS aus mit 0,1 mM Diepoxybutan (DEB) behandelten Mäuseleberzellkernen (vergl. Abb.23)

% zurückgehaltene DNS auf dem Filter
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

t (h)	1,0 mM DEB	1,0 mM DEB + Proteinase K	1,0 mM DEB + 600 rad	1,0 mM DEB + Proteinase K + 600 rad
1	96,2 $\pm$ 0,3	95,1 $\pm$ 1,0	91,0 $\pm$ 0,7	68,2 $\pm$ 0,6
2	94,6 $\pm$ 0,5	89,8 $\pm$ 0,6	74,5 $\pm$ 0,4	66,0 $\pm$ 0,6
3	92,5 $\pm$ 0,5	87,2 $\pm$ 0,7	62,3 $\pm$ 0,6	54,9 $\pm$ 0,7
4	89,9 $\pm$ 1,0	84,5 $\pm$ 0,3	52,4 $\pm$ 0,2	46,8 $\pm$ 0,8
5	87,2 $\pm$ 1,3	82,1 $\pm$ 0,6	46,1 $\pm$ 0,5	38,2 $\pm$ 0,3
6	85,1 $\pm$ 0,2	79,2 $\pm$ 0,2	41,1 $\pm$ 0,4	33,7 $\pm$ 1,0
7	84,0 $\pm$ 0,4	77,0 $\pm$ 0,4	36,0 $\pm$ 0,2	29,8 $\pm$ 0,4
8	82,7 $\pm$ 1,2	71,8 $\pm$ 0,5	33,9 $\pm$ 0,3	27,1 $\pm$ 0,5
9	81,0 $\pm$ 0,2	68,7 $\pm$ 1,2	31,7 $\pm$ 0,6	25,4 $\pm$ 0,4
10	80,0 $\pm$ 0,4	66,2 $\pm$ 0,8	30,3 $\pm$ 0,3	23,8 $\pm$ 1,2
11				21,8 $\pm$ 1,2

Tab. 12: Alkalische Elution von DNS aus mit 1,0 mM Diepoxybutan (DEB) behandelten Mäuseleberzellkernen (vergl. Abb.22)

Alderson, T. (1985): Formaldehyde-induced mutagenesis: a novel mechanism for its action. Mutat. Res. 154: 101-110

Anonym: Chlormethan - BUA-Stoffbericht 7 (November 1986), hrsg. vom Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Weinheim, New York, VCH Verlagsgesellschaft, 1987

Baker, H.M. (1927): Intoxication with commercial methyl chloride. Report of a series of cases; J. Am. Med. Ass. 88: 1137-1138

Batelle Columbus Laboratories (1981): Final report on a chronic inhalation toxicology study in rats and mice exposed to methyl chloride submitted to the Chemical Industry Institute of Toxicology, Vol. 1-4; siehe auch: Toxicologist 2: 161 (1982) (Abstract)

Barnsley, E.A. (1964): The metabolism of S-Methyl-L-cysteine in the rat; Biochim. Biophys. Acta 90: 24-36

Beland, F.A.; Dooley, K.L.; Casciano, D.A. (1979): Rapid isolation of carcinogen-bound DNA and RNA by hydroxyapatite chromatography; J. Chromatogr. 174: 177-186

Berg, S; Frostling, H.; Jacobsson, S. (1978): Chemical analysis of fire gases with gas chromatography-mass spectrometry; in: Proceedings of an International Symposium on the Control of Air Pollution in the Work Environment, Part 1, Stockholm, Arbetarskyddsfonden, pp. 309-321

Bolt, H.M. (1984): Bericht und Gutachten über Untersuchungen zur DNA-Bindung von Methylchlorid (Chlormethan); Institut für Arbeitsphysiologie, Dortmund

Bolt, H.M.; Schmiedel, G; Filser, J.G.; Rolzhäuser, H.P.; Wistuba, D.; Schurig, V. (1983): Biological activation of 1,3-butadiene to vinyl oxirane by rat liver microsomes and expiration of the reactive metabolite by exposed rats; J.Cancer Res. Clin. Oncol. 106: 112-116

Bolt, H.M.; Filser, J.G.; Störmer, F. (1984): Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. V. Comparative pharmacokinetics of ethylene and 1,3-butadiene in rats; Arch. Toxicol. 55: 213-218

Bond, J.A.; Dahl, A.R.; Henderson, R.F.; Dutcher, J.S.; Mauderly, J.L.; Birnbaum, L.S. (1986): Species differences in the disposition of inhaled butadiene; Toxicol. Appl. Pharmacol. 84: 617-627

Brookes, P.; Lawley, P.D. (1961): The alkylation of guanosine and guanylic acid; J. Chem. Soc. 3923-3928

Bus, J.S. (1978): Disposition of ^{14}C -methyl in Fisher 344-rats after inhalation exposure; Pharmacologist 20 (3): 214

Bus, J.S. (1982): Integrated studies of methyl chloride toxicity; CIIT Activities 2: 3-4

Carter, C.; Britton, V.J.; Haff, L. (1983): CsTFATM: a centrifugation medium for nucleic acid isolation and purification; in: Biotechniques, pp. 142-147

Craft, T.R.; Bermudez, E.; Skopek, T.R. (1987): Formaldehyde mutagenesis and formation of DNA-protein crosslinks in human lymphoblasts in vitro; Mutat. Res. 176: 147-155

Deitrich, R.A. (1966): Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde oxidizing capacity; Biochemical Pharmacology; 15: 1911-1922

De Meester, C; Poncelet, F; Roberfroid, M.; Mercier, M. (1978): Mutagenicity of butadiene and butadiene monoxide; Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 298-305

De Meester, C.; Poncelet, F.; Roberfroid, M.; Mercier, M. (1980): The mutagenicity of butadiene towards Salmonella typhimurium; Toxicol. Lett. 6: 125-130

Djalali-Behzad, G.; Hussain, S.; Osterman-Golkar, S.; Segerbäck, D. (1981): Estimation of genetic risks of alkylating agents. VI. Exposure of mice and bacteria to methyl bromide. Mutat. Res. 84: 1-9

Dodd, D.E.; Bus, J.S.; Barrow, C.S. (1982): Nonprotein sulfhydryl alterations in F-344 rats following acute methyl chloride inhalation; Toxicol. Appl. Pharmacol. 62: 228-236

Doorn, R. van; Borm, P.J.A.; Leijdekkers, C.M.; Henderson, P. Th.; Reuvers, J.; Bergen, T.J. van (1980): Detection and identification of S-Methylcysteine in urine of workers exposed to methyl chloride; Int. Arch. Occup. Environ. Health 46: 99-109

Dunn, R.C.; Smith, W.W. (1947): Acute and chronic toxicity of methyl chloride; Archives of Pathology 43: 296-300

Edwards, P.R.; Campbell, J.; Milne, G.S. (1982): The impact of chloromethanes on the environment - Part 2; Chemistry and Industry, September 4., 619-622

Erickson, L.C.; Osieka, R.; Sharkey, N.A.; Kohn, K.W. (1980): Measurement of DNA damage in unlabelled mammalian cells analysed by alkaline elution and a fluorometric DNA assay; Anal. Biochem. 106: 169-174

Filser, J.G.; Bolt, H.M. (1984): Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. VI. Comparative evaluation of ethylene oxide and butadiene monoxide as exhaled reactive metabolites of ethylene and 1,3-butadiene in rats; Arch. Toxicol. 55: 219-223

Grafstrom, R.C.; Fornace, A.J. jr.; Autrup, H.; Lechner, J.F.; Harris, C.C. (1983): Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells; Science 220: 216-218

Grunicke, H.; Bock, K.W.; Becker, H.; Gäng, V.; Schmieder, J.; Puschendorf, B. (1973); Cancer Res. 33: 1084

Hallier, E.; Peter, H. (1988): Methyl chloride metabolism by human erythrocyte glutathione transferases; Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 337, R 20 (79)

Hallier, E.; Bolt, H.M.; Jäger, R.; Peter, H. (1988): Glutathiontransferasen in Humanerythrozyten und ihre Bedeutung für den Metabolismus von Methylchlorid; Beitrag zum Arbeitsmedizin-Kongress vom 4.-7. Mai 1988 in Innsbruck

Hancock, R. (1970): Separation by equilibrium centrifugation in CsCl gradients of density-labelled and normal deoxyribonucleoprotein from chromatin; 48: 357-360

Hansen, H.; Weaver, N.K.; Venable, F.S. (1953): Methyl chloride intoxication; Arch. of Ind. Hyg. and Occup. Med. 8: 328-334

Hatch, G.G.; Mamay, P.D.; Ayer, M.L.; Casto, B.C.; Nesnow, S. (1983): Chemical enhancement of viral transformation in Syrian hamster embryo cells by gaseous and volatile chlorinated methanes and ethanes; Cancer res. 43: 1945-1950

Hawke, R.L.; Welch, R.M. (1985): Major differences in the specificity and regulation of mouse renal cytochrome P-450-dependent monooxygenases; Molec. Pharmacol. 27: 283-289

Hazleton Laboratories Europe (1981): The toxicity and carcinogenicity of butadiene gas administered to rats by inhalation for approximately 24 months; Final Report, No. 2635-522/2, Hazleton Labs., Harrowgate HG 3 1 PY, England

Heck, H.D.A.; White, E.L.; Casanova-Schmitz, M. (1982): Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry; Biomed. Mass Spectrom. 9: 347-353

Henschler, D. (Hrsg.): Methylchlorid. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizin. Begründung von MAK-Werten; Verlag Chemie, Weinheim, 1. Nachdruck 1974

Henschler, D. (Hrsg.) Methylchlorid, Nachtrag 1984. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten; Verlag Chemie, Weinheim, 10. Lieferung 1984

Hudspeth, M.E.S.; Shumard, D.S.; Tatti, K.M.; Grossman, L.I. (1980): Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield; Biochim. Biophys. Acta, 610: 221-228

Huff, J.E.; Melnick, R.L.; Sollefeld, H.A.; Hasemann, J; Powers, M.; Miller, R.A. (1985): Multiple organ carcinogenicity of 1,3-butadiene in B6C3F1 mice after 60 weeks of inhalation exposure; Science 227: 548-549

Jäger, R. (1988): Untersuchungen zum Metabolismus und zum toxikologischen Wirkmechanismus von Methylhalogeniden (Methylchlorid, Methylbromid); Inaugural-Dissertation im Fachbereich Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen

Jäger, R; Peter, H.; Sterzel, W.; Bolt, H.M. (1988): Biochemical effects of methyl chloride in relation to its tumorigenicity; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 114: 64-70

Jelitto, B.; Laib, R.J.; Vangala, R.R. (1988): Species-differences in DNA damage by butadiene: role of diepoxybutane; Poster in Eurotox 1988

Johnson, M.K. (1966): Metabolism of iodomethane in the rat; Biochem. J. 98: 38-43

Kluwe, W.M. (1981): The nephropathy of low molecular weight halogenated alkane solvents, pesticides, and chemical intermediates; in: Toxicology of the Kidney (J.B. Hook, ed.), pp. 193-210, Raven Press, New York

Kohn, K.W.; Spears, C.L.; Doty, P (1966): Interstrand cross-linking of DNA by nitrogen mustard; J. Mol. Biol. 19: 266-288

Kohn, K.W.; Spears, C. (1967): Alkylated DNA: Buoyant density changes and modes of decomposition; Biochim. Biophys. Acta 145: 720-733

Kohn, K.W. (1979): DNA as a target in cancer chemotherapy: measurement of macromolecular DNA damage produced in mammalian cells by anticancer agents and carcinogens. Meth. Canc. Res. 16: 291-345

Kohn, K.W.; Ewig, R.A.G.; Erickson, L.C.; Zwelling, L.A. (1981): Measurement of strand breaks and crosslinks by alkaline elution; in: DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures (E.C. Friedberg, P.C., Hanawalt, eds.)pp. 379-301, Marcel Dekker, New York

Kohn, K.W. (1981): DNA-damage in mammalian cells; Bioscience 31: 593-597

Kohn, K.W. (1983): The significance of DNA-damage assays in toxicity and carcinogenicity assessment; in: Cellular Systems for Toxicity Testing 407, Annals of the New York Academy of Sciences, pp. 106-118

Koivula, T.; Koivusalo, M. (1975): Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution; *Biochim. Biophys. Acta* 397, 9-23

Kornbrust, D.J.; Bus, J.S. (1982): Metabolism of methyl chloride to formate in rats; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 135-143

Kornbrust, D.J.; Bus, J.S.; Doerjer, G; Swenberg, J.A. (1982): Association of inhaled ^{14}C -methyl chloride with macromolecules from various rat tissues; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 122-134

Kornbrust, D.J.; Bus, J.S. (1983): The role of glutathione and cytochrome P-450 in the metabolism of methyl chloride; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67: 246-256

Kornbrust, D.J.; Bus, J.S. (1984): Glutathione depletion by methyl chloride and association with lipid peroxidation in mice and rats; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 388-399

Kraybill, H.F. (1980): Evaluation of public health aspects of carcinogenic/mutagenic biorefractories in drinking water; *Prev. Med.* 9: 212-218

Kreiling, R. (1987): Studien zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus der krebserregenden Wirkung von 1,3-Butadien: Ein Speziesvergleich; Inaugural-Dissertation im Fachbereich Ernährungs- und Haushaltswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

Landry, T.D.; Gushow, T.S.; Langvardt, P.W.; Wall, J.M.; McKenna, M.J. (1983): Pharmacokinetics and metabolism of inhaled methyl chloride in the rat and dog; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 68: 473-486

Lawley, P.D.; Brookes, P. (1967): Interstrand crosslinking of DNA by difunctional alkylating agents; *J. Mol. Biol.* 25, 143-160

Lieser, K. (1983): Tierexperimentelle Pharmakokinetik von 1,3-Butadien; Inaugural-Dissertation im Fachbereich Medizin der Universität Mainz

Llewellyn, O.P. (1966): Halogenated hydrocarbons used as solvents; Ann. Occup. Hyg. 9: 199

Longstaff, E.; Robinson, M.; Bradbrook, C.; Styles, J.A.; Purchase, I.F.H. (1984): Genotoxicity and carcinogenicity of fluorocarbons: Assessment by short-term in vitro tests and chronic exposure in rats; Toxicol. Appl. Pharmacol. 72: 15-31

Lovelock, J.E. (1975): Atmospheric halocarbons and stratospheric ozone; Nature (London) 252: 292-294

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent; J. Biol. Chem. 193: 265-275

Malvoisin, E.; Roberfroid, M. (1982): Hepatic mirosomal metabolism of 1,3-butadiene; Xenobiotica 12: 137-144

Malvoisin, E.; Lhoest, G.; Poncelet, F.; Roberfroid, M.; Mercier, M. (1979): Identification and quantification of 1,2-epoxybuten-3 as the primary metabolite of 1,3-butadiene; J. Chromatography. 178: 419-425

Malvoisin, E.; Mercier, M.; Roberfroid, M. (1982): Enzymic hydration of butadiene monoxide and its importance in the metabolism of butadiene; in: Biological reactive intermediates, Vol II, Part A, Snyder, R.; Parke, D.V. (eds.), Plenum Publ., New York, pp. 437-444

Matanoski, G.M.; Schwartz, L.; Sperazza, J. Tonascia, J. (1982): Mortality of workers in the styrene-butadiene rubber polymer manufacturing industry; Report for the International Institute of Synthetic Rubber Producers, Inc., John Hopkins University, Baltimore, Md., USA

- Mazel, P; Henderson, J.F.; Axelrod, J. (1964): S-Demethylation by microsomal enzymes; J. Pharmacol. Exp. Ther. 143: 1-6
- McLeod, M.C.; Mansfield, B.K.; Huff, A; Selkirk, J.K. (1979): Simultaneous preparation of nuclear DNA, RNA and protein from carcinogen treated-hamster embryo fibroblasts; Anal. Biochem. 97: 410-417
- Miller, L.M. (1978): Investigation of selected potential environmental contaminants: Butadiene and its oligomers (EPA-560/2-78-008; NTIS PB-291684), Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances
- Mirkes, P.E. (1985): Simultaneous banding of rat embryo DNA, RNA and protein in cesium trifluoroacetate gradients; Anal. Biochem. 148: 376-383
- Mitchell, S.C.; Smith, R.L.; Waring, R.H.; Aldington, G.F. (1984): The metabolism of S-methyl-L-cysteine in man; Xenobiotika 14: 767-779
- Monster, A.C.; Zielhuis, R.L. (1983): Chlorinated hydrocarbon solvents: monochloromethane, dichloromethane, trichloromethane; in: Human biological monitoring of industrial chemicals series (L. Alessio, A. Berlin, R. Roi, M. Boni: Eds), ECSC-EEC-EAEC, Brussels Luxemburg, pp. 47-63
- Morgan, A.; Black, A.; Belcher, D.R. (1970): The excretion in breath of some aliphatic halogenated hydrocarbons following administration by inhalation; Ann. Occup. Hyg. 13: 219-233
- Müller, N.; Eisenbrand, G.C. (1985): The influence of N⁷-substituents on the stability of N⁷-alkylated guanosines; Chem. Biol. Interact. 53: 173-181
- Neligan, R.E. (1962): Hydrocarbons in the Los Angeles atmosphere. A comparison between the hydrocarbons in automobile exhaust and those found in the Los Angeles atmosphere; Arch. Environ. Health 5: 581-591

Nicolini, C.; Robbiano, L.; Pino, A.; Maura, A; Finollo, R; Brambilla, G. (1985): Higher sensitivity for the detection of chemically-induced DNA damage: role of DNA unfolding in determining alkaline elution rate; Carcinogenesis 6: 385-389

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health): Monohalomethanes - methyl chloride, methyl bromide, methyl iodide; Current Intelligence Bulletin 43. DHHS (NIOSH) Publ. No. 84-117, Cincinnati, Ohio, 1984

Nolan, R.J.; Rick, D.L.; Landry, T.D.; Mc Carty, L.P.; Agin, G.L.; Saunders, J.H. (1985): Pharmacokinetics of inhaled methyl chloride in male volunteers; Fundamental and Applied Toxicology 5: 361-369

Oettingen, W.F. von (1955): The halogenated hydrocarbons - Toxicity and potential dangers; Public Health Service, Publ. No 414, U.S. Department of Health, Education and Welfare, zitiert in Repko & Lasley 1979

Ottenwälder, H.; Ristau, C.; Jäger, R.; Peter, H.; Bolt, H.M. (1987): Vergleichende Betrachtungen zum Metabolismus von Halomethanen; in: Verh. Dtsch. Ges. Arbeitsmed., Gentner-Verlag, Stuttgart, 181-184

Parsons, T.B.; Wilkins, G.E. (1976): Biological effects and environmental aspects of 1,3-butadiene. Final report; (EPA-560/2-76-004; PB-253982), Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances

Peter, H.; Laib, R.J.; Ottenwälder, H.; Topp, H.; Rupprich, N.; Bolt, H.M. (1985): DNA-binding assay of methyl chloride; Arch. Toxicol. 57: 84-87

Putz-Anderson, V.; Setzer, J.V.; Croxton, J.S.; Phipps, F.C. (1981): Methyl chloride and diazepam effects on performance; Scand. J. work Environ. Hlth. 7: 8-13

Redford-Ellis, M.; Gowenlock, A.H. (1971): Studies on the reaction of chloromethane with human blood; *Acta pharmacol. et toxicol.* 30: 36-48

Repko, J.D.; Lasley, S.M. (1979): Behavioral, neurological and toxic effects of methyl chloride: A review of the literature; *Critical Reviews in Toxicology* 6 (4): 283-302

Reynolds, E.S.; Yee, A.G. (1967): Liver parenchymal cell injury. V. Relationships betw. patterns of chloromethane-¹⁴-C incorporation into constituents of liver in vivo and cellular injury; *Lab. Invest.* 16 (14): 591-603

Rickwood, D; Birnie, G.D. (1976): Preparation, characterization and fractionation of chromatin; in: *Subnuclear Components, Preparation and Fractionation*, Birnie, G.D. (ed.), Butterworth, London, pp. 129-180

Rosenthal, S.L. (1985): The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of 1,3-butadiene and its reactive metabolites; *Environ. Mutagen*, 7: 933-945

Ross W.E.; Shipley, N. (1980): Relationship between DNA damage and survival in formaldehyde treated mouse cells; *Mutat. Res.* 79: 277-283

Schmidt, U.; Loeser, E. (1985): Species differences in the formation of butadiene monoxide from 1,3-butadiene; *Arch. Toxicol.* 57: 222-225

Searl, C.E. (1976): Chemical carcinogens; in: *ACS Monograph 173*; American Chemical Society (F. Marshall Beringer, ed.)

Simmon, V.F.; Kauhanen, K.; Tardiff, R.G. (1977): Mutagenic activities of chemicals identified in drinking water; in: D. Scott, B.A. Bridges and F.A. Sobels (eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Amsterdam: Elsevier/North Holland. Bio-medical Press, 249-258

Simmon, V.F. (1978): Structural correlations of carcinogenic and mutagenic alkyl halides; in: I.M. Asher & C. Zervos (eds.), Structural Correlations of Carcinogenesis and Mutagenesis. A Guide to testing priorities, 163-171

Sina, J.F.; Bean, L.C.; Dysart, G.R.; Taylor, V.I.; Bradley, M.O. (1983): Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mutat. Res.* 113: 357-391

Sklan, N.M.; Barnsley, E.A. (1968): The metabolism of S-methyl-L-cysteine; *Biochem. J.* 107: 217-223

Smith, W.W.; Oettingen, W.F. von (1947): The acute and chronic toxicity of methyl chloride. I. Mortality resulting from exposures to methyl chloride in concentrations of 4000 to 300 parts per million; *J. Industr. Hyg. and Toxicol.* 29: 123-128

Soucek, B. (1961): Retention und Ausscheidung von Methylchlorid und Tetrakohlenstoff bei Ratten; *Archiv für Gewerbepathologie und Gewerbehygiene* 18: 370-383

Startin, J.R.; Gilbert, J. (1984): Single ion monitoring of butadiene in plastics and foods by coupled mass-spectrometry-automatic headspace gas chromatography; *J. Chromatogr.* 294: 427-430

Sternbach, H. (1985): DNA durch ionische Dichtegradientenzentrifugation; in: *Biochemie, Laborpraxis*

Sterzel, W.; Bedford, P.; Eisenbrand, G. (1985): Automated determination of DNA using the fluorochrome Hoechst 33258; *Anal. Biochem.* 147: 462-467

Ulsamer, A.G.; Beall, J.R.; Kang, H.K.; Frazier, J.A. (1984): Overview of health effects of formaldehyde; in: *Hazard Assessment of Chemicals: Current Developments*, Vol. 3. pp. 337-399

Uoityla, L.; Koivusalo, M. (1974): Formaldehyde dehydrogenase from human liver; J. Biol. Chem. 249: 7653-7663

Uotila, L.; Koivusalo, M. (1981): Formaldehyde dehydrogenase; in: Methods in Enzymology (Ed. W.B. Jacoby), Vol. 77: Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems, pp. 314-320, Academic Press, New York

Uotila, L.; Koivusalo, M. (1983): Formaldehyde dehydrogenase. In: Functions of Glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects (Eds. A. Larsson, S. Orrenius, A., Holmgren, B. Mannervik), pp. 175-186, Raven Press, New York

Van Duuren, B.L.; Langseth, L.; Orris, L.; Teebor, G; Nelson, N.; Kuschner, M. (1966): Carcinogenicity of epoxides, lactones and peroxy compounds IV. Tumor response in epithelial and connective tissue in mice and rats; J. Natl. Cancer Inst. 37: 825-835

Van Duuren, B.L.; Langseth, L.; Goldschmidt, B.M.; Orris, L. (1967): Carcinogenicity of epoxides, lactones and peroxy compounds VI. structure and carcinogenic activity; J. Natl. Cancer Inst. 39: 1217-1228

Van Duuren, B.L. (1969): Carcinogenic epoxides, lactones and halo-ethers and their mode of action; Annals of the New York Academy of Science 163: 633-650

Vangala, R.R.; Neidhart, B.; Laib, R.J. (1987): Untersuchungen zur Bedeutung von Epoxybuten und Diepoxybutan im Metabolismus von Butadien mit Hilfe der alkalischen Filterelution. Verh. Dt. Ges. Arbeitsmed. 27: 561-564

Vangala, R.R.; Jelitto, B. (1989): Concentration-dependent crosslinking activity of butadiene in rats and mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. to Vol. 339: R 22

Voogd, C.E.; van der Stel, J.J.; Jacobs, J.A. (1981): The mutagenic action of aliphatic epoxides; *Mutat. Res.* 89: 269-282

Walker, C.H. (1978): Species differences in microsomal monooxygenase activity and their relationship to biological half-lives; *Drug Metab. Rev.* 7: 295-323

Weisburger, E.K. (1966): Carcinogenicity of alkylating agents; *Public Health Reports* 81: 772-776

White, R.D.; Norton, R.; Bus, J.S. (1982): Evidence for S-Methyl-Glutathione metabolism in mediating the acute Toxicity of methyl chloride; *The Pharmacologist* 24: 172

White, R.D.; Norton, R.; Bus, J.S. (1983): Potential role for enterohepatic circulation in mediating methyl chloride toxicity in male B6C3F1 mice; *The Pharmacologist* 25: 228

Working, P.K.; Doolittle, D.J.; Smith-Oliver, T; White, R.D.; Butterworth, B.E. (1986): Unscheduled DNA synthesis in rat tracheal epithelial cells, hepatocytes and spermatocytes following exposure to methyl chloride in vitro and in vivo; *Mutat. Res.* 162: 219-224

Zafiriou, O.C. (1975): Reaction of methyl halides with sea water and marine aerosols; *J. Marine Res.* 33: 73-79

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund unter der Leitung des Direktors der Abteilung Toxikologie und Arbeitsmedizin, Professor Dr. Dr. H.M. Bolt.

Herrn Professor Dr. Dr. H.M. Bolt danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie für den großzügig gewährten Freiraum bei der experimentellen Durchführung der Versuche.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. H. Ottenwälder und Herrn Dr. R. Laib für zahlreiche kritische Diskussionen und Anregungen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. R. Vangala für die Unterstützung bei den Untersuchungen zur alkalischen Elution sowie seinen beiden Mitarbeiterinnen Frau A. Pläger und Frau C. Pütt für ihre Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

Des weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe. Frau K. Brandt und Frau Jansen (Fotolabor) gilt mein Dank für die Anfertigung der Abbildungen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. A. Trebst, Leiter der Abteilung "Biochemie der Pflanzen", Ruhr-Universität Bochum, für die Übernahme des Referats sowie für seine stete Bereitschaft zur Diskussion. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. W. Hengstenberg für die Übernahme des Korreferats.

